

**Untersuchungen zur biologischen Funktion des Retinols (Vitamin A)
als Lipidintermediat in der Glycoproteinbiosynthese**

Nachweis eines retinolspezifischen Mannosylierungsweges
in der Leberzelle

Dissertation

Jürgen Hemberger

München 1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548306_0009

Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried

Untersuchungen zur biologischen Funktion des Retinols (Vitamin A)
als Lipidintermediat in der Glycoproteinbiosynthese

Nachweis eines retinolspezifischen Mannosylierungsweges in
der Leberzelle

Dissertation

Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt
von

Jürgen Hemberger

München
1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 1984

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1980 bis November 1983 auf Anregung und unter der Leitung von Prof. Dr. Dieter Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried durchgeführt.

Herrn Prof. Oesterhelt danke ich herzlich für die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit. Mein besonderer Dank gilt außerdem Traci Topping für ihre engagierte Hilfe in der Endphase dieser Arbeit und allen Mitarbeitern der Abteilung Oesterhelt für die unverwechselbar gute Arbeitsatmosphäre.

"The field of Vitamin A-research remains exciting-
the molecules are elegant, their chemistry fasci-
nating, their transformations interesting, their
functions vital, their nutrition in man and animal
important and their therapeutic uses beneficial."

(Olson J.A.,1983)

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	5
2.1 Glycoproteine	5
2.1.1 Definitionen	5
2.1.2 Struktur und Funktionen	5
2.1.3 Synthese von O-Glycosiden	9
2.1.4 Synthese von N-Glycosiden	11
2.2 Retinol	18
2.2.1 Biosynthese und Metabolismus	18
2.2.2 Funktionen	21
2.3 Hypothesen zum molekularen Mechanismus der Retinoidwirkung	24
2.3.1 Hormontheorie	24
2.3.2 Direkte Beteiligung von Retinoiden an der Glycoprotein-Biosynthese	26
2.4 Ziel der Arbeit	29
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 Chemikalien und Lösungen	30
3.2 Geräte	31
3.3 Präparation von Rattenleberfraktionen	31
3.3.1 Mikrosomale Fraktion	31
3.3.2 Hochgereinigte Rattenleberfraktionen	32
3.4 Substratsynthesen	33
3.4.1 Synthese von Ret-P ₃₂	33
3.4.2 Synthese von Ret- ³² P	37
3.4.3 Synthese von Dol- ³² P	39
3.4.4 Enzymatische Synthese von Ret-P-(¹⁴ C)Man	40
3.4.5 Photochemische Erzeugung und Abtrennung von cis-Ret-P	43
3.5 Testsysteme	44
3.5.1 Test für GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferase	44
Inkubationen	44
Folch-Extraktion	45

Reversed phase-HPLC	46
3.5.2 Test des Mannosetransfers auf endogene Akzeptoren	48
3.6 Chromatographische Methoden	48
3.6.1 Papierchromatographie	48
3.6.2 Dünnschichtchromatographie	49
3.6.3 Gelfiltration an AcA 34	49
3.6.4 Hydroxylapatitchromatographie	50
3.6.5 Chromatographie an DEAE-Sephacel	50
3.7 Allgemeine Methoden	51
3.7.1 Gelelektrophorese	51
3.7.2 Elektroelution	51
3.7.3 Solubilisierung	52
3.7.4 Polyethylenqlycoll-Fällung	52
3.7.5 Lipidextraktion	53
3.7.6 Herstellung von Phospholipid-Vesikeln	53
3.7.7 Hydrolyse von Ret-P-Man	54
3.7.8 Hydrolyse von O-glycosidschen Oligosacchariden	54
3.8 Analytische Methoden	55
3.8.1 Proteinbestimmung	55
3.8.2 Phosphatbestimmung	55
3.8.3 Enzymatische Tests	56
4. ERGEBNISSE	57
4.1 Charakterisierung der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase	57
4.1.1 Optimierung der Testbedingungen	57
4.1.2 Solubilisierung	66
4.1.3 Charakterisierung der solubilisierten GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase	74
4.1.4 Subzelluläre Verteilung	82
4.1.5 Endogenes Ret-P	87
4.1.6 Einbau von markiertem Phosphat aus Ret- ³² P in Ret-P-Man	90
4.1.7 Proteinmarkierung durch Ret- ³² P/Dol- ³² P	95
4.1.8 Kompetitionsexperimente	100
4.2 Substratspezifität der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase	103
4.2.1 Spezifität gegenüber Nukleotidzuckern	103
4.2.2 Spezifität gegenüber Lipidphosphat	104
4.3 Trennung beider GDP-Man:Lipidphosphat-Mannosyltransferasen und Anreicherungsversuche	109

4.3.1	Solubilisierete Enzymfraktion	109
4.3.2	Trennung von Ret-P-Man und Dol-P-Man-Aktivität	111
4.3.3	Anreicherungsversuche für die GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase	113
4.4	Mannosetransfer auf endogene Akzeptoren	118
4.4.1	Vergleich möglicher Mannosendonatoren	118
4.4.2	Subzelluläre Verteilung	119
4.4.3	Charakterisierung der Ret-P-Man:Protein-Mannosyltransferase	121
4.4.4	Endogene Akzeptoren	125
5.	DISKUSSION	127
6.	LITERATURVERZEICHNIS	141
7.	ABKÜRZUNGEN	159

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die hier vorgelegten Untersuchungen beschäftigen sich mit der vermuteten Rolle des Retinols (Vitamin A) als Lipidinintermediat bei der Glycoprotein-Biosynthese. Die Hypothese einer Beteiligung von Retinol an der Mannosylierung von Proteinen, als einer Erklärungsmöglichkeit biologischer Retinoleffekte, wurde zwar schon 1970 von De Luca und Wolf formuliert (De Luca et al., 1970), ein schlüssiger Nachweis stand jedoch zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch aus. Im einzelnen wurden an Leberzellen aus Ratten folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Es wurde ein Test auf die Bildung des Lipidinintermediats Retinyl-phospho-mannose (Ret-P-Man) entwickelt, der es erlaubt, alle für die Fragestellung relevanten Substanzen nebeneinander zu bestimmen. Dies wurde durch Auftrennung einer Chloroform/Methanol-Extraktion nach Inkubation von Rattenleberfraktionen mit den Substraten Retinylphosphat (Ret-P) und GDP-Mannose auf einer Reversed phase-HPLC-Säule erreicht. Die Inkubationsbedingungen für die Ret-P-Man-Synthese wurden optimiert und eine Steigerung der Syntheseraten um den Faktor 15 gegenüber Literaturdaten (Sasak & DeLuca, 1980) erzielt.
- (2) Die Solubilisierung der membrangebundenen GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase (Ret-P-Man-Synthase) in relativ stabiler Form wurde mit 2% Brij 58 erreicht, wobei in vergleichenden Untersuchungen mit 25 verschiedenen Detergentien eine deutliche Beziehung zwischen Detergensstruktur und Solubilisierungsvermögen für das Ret-P-Man-synthetisierende Enzym herausgearbeitet wurde. Vergleichende Charakterisierung dieses Enzyms in

gelöster Form mit der schon bekannten dolicholabhängigen GDP-Man:Dol-P-Mannosyltransferase erbrachte Hinweise auf das Vorliegen zweier verschiedener Enzyme. Diese stützten sich auf das Verhalten gegenüber Detergentien, sowie Aktivatoren wie Phosphat und BSA, die Kinetik der Produktbildung, p_H -Optima, Proteinabhängigkeit, Stimulierung durch zweiwertige Kationen und K_M -Wert gegenüber GDP-Mannose. Außerdem wurde eine unterschiedliche Verteilung beider Enzymaktivitäten in subzellulären Fraktionen gefunden.

- (3) Konkurrenzexperimente mit Ret-P/Dol-P legten das Vorhandensein zweier unabhängig voneinander wirkender GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferasen nahe. Bei Anwesenheit von sättigenden Konzentrationen an Ret-P (300 μ M) zeigte sich keine erkennbare Beeinflussung der Dol-P-Man-Syntheseaktivität im gesamten Dol-P-Konzentrationsbereich, d.h. von nur endogenem bis zu sättigenden Konzentrationen an exogenem Dol-P (560 μ M).
- (4) Endogenes Ret-P in Rattenlebermikrosomen konnte durch Umsetzung mit radioaktiv markierter GDP-Mannose nachgewiesen werden. Die Konzentration betrug 3.2 pMol Ret-P/mg Protein, was einem Anteil von 4% am Gesamtretinolgehalt von Mikrosomen entspricht.
- (5) Untersuchungen zum Mechanismus der Ret-P-Man-Bildung zeigten durch 32 P-Markierungsversuche, daß der Phosphatsauerstoff von Ret-P nucleophil am C-1 der Mannose angreift, was zur Abspaltung von GDP und zur Inversion der Konfiguration an diesem C-Atom (α -Anomer in GDP-Man, β -Anomer in Ret-P-Man) führt.
- (6) Ret-P und Dol-P markierten verschiedene, jedoch eng benachbarte Proteine in einer nichtdenaturierenden Gelelektrophorese. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese dieser Banden nach Elektroelution lieferte zwei

Hauptbanden mit den apparenten Molekulargewichten von 62 000 und 69 000 Dalton.

- (7) Die Ret-P-Man-Synthase besitzt eine absolute Spezifität gegenüber GDP-Mannose. Andere aktivierte Zucker wurden von Ret-P nicht akzeptiert, während Dol-P auch mit UDP-Glucose und UDP-Glucosamin reagiert. Durch modifizierte Retinylphosphate konnte gezeigt werden, daß die Intaktheit der konjugierten Seitenkette des Retinols zur Aufrechterhaltung der Aktivität als Substrat der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase essentiell ist. Mit Phenylretinylphosphat (integrierter Phenylring in der Seitenkette) wurden nur noch 43%, mit 13-cis-Ret-P sogar nur 22% der Ausgangsaktivität erhalten.
- (8) Eine Trennung der Ret-P-abhängigen und Dol-P-abhängigen Lipid-P-Man-Syntheseaktivitäten und damit der Nachweis eines eigenen Mannosylierungsweges über Retinol wurde durch differentielle Polyethylenglykoll-Fällung erreicht. Dabei lag das Maximum der Ret-P-Man-Synthase im Pellet der 4%, das der Dol-P-Man-Synthase in der 6%-Fraktion.
- (9) Anreicherungsversuche der solubilisierten Ret-P-Man-Synthase durch Säulenchromatographie nach den verschiedensten Trennprinzipien (Gelfiltration, Hydroxylapatit-, Ionenaustausch- und Hydrophobe Chromatographie, Chromatofokussierung) brachten wegen der großen Instabilität des Enzyms nach Chromatographieläufen und den damit verbundenen niedrigen Aktivitäten nur unbefriedigende Resultate. Der maximal erreichte Anreicherungsfaktor lag nach zweimaliger Gelfiltration an AcA 34 bei 22-fach, bezogen auf die mikrosomale Membranfraktion und bei 105-fach, bezogen auf das Leberhomogenat.
- (10) Der Mannosetransfer über Ret-P-Man auf endogene

Akzeptoren hatte die höchste Aktivität im Golgi-Apparat und wurde bezüglich Kinetik, Substrat-, Protein- und Detergensabhängigkeit charakterisiert. Gelfiltrationsexperimente und Spaltungen mit Protease belegten den Proteincharakter der Mannoseakzeptoren. Mehr als 85% der transferierten Mannosen waren O-glycosidisch gebunden. Das deutet auf die besondere Rolle des Golgi-Apparates bei der retinolvermittelten Mannosylierung hin, da die Synthese von O-Glycosiden nach allgemein akzeptierten Vorstellungen dort lokalisiert ist.

Aus diesen Befunden, die deutlich für einen spezifischen Retinolweg der Mannosylierung von Proteinen sprechen, wurde eine neue modellhafte Vorstellung von der Beteiligung dieses, für tierische Zellen äußerst wichtigen Lipids, an der Glycoprotein-Biosynthese entwickelt. Das Lipidintermediat Ret-P-Man wird im RER/SER von einem für beide Substrate hochspezifischen Enzym aus GDP-Mannose und Ret-P synthetisiert. Vom Syntheseort wird dieses Intermediat zum eigentlichen Wirkort, dem Golgi-Apparat transportiert, wo es für die Mannosylierung beim Aufbau von O-glycosidischen Kohlenhydratketten verantwortlich ist. Diese Mannosereste könnten als Signal für die Verteilung der reifen Glycoproteine in die verschiedenen Zellkompartimente wirken.

2. EINLEITUNG

2.1 Glycoproteine

2.1.1 Definitionen

Von vielen in der Literatur existierenden Definitionsversuchen für Glycoproteine, scheint diejenige von Gottschalk (Gottschalk, 1972) allgemein akzeptiert zu sein.

Er definiert Glycoproteine als Polypeptide, die eine oder mehrere Heterosaccharid-Ketten O- oder N-glycosidisch kovalent gebunden enthalten, wobei das Protein den größeren Anteil am Gesamtmolekül hat. Im Gegensatz dazu werden unter Proteoglycanen Moleküle verstanden, deren Polysaccharidanteil den des Proteins überwiegt und aus repetitiven Einheiten eines Disaccharids besteht (z.B. Polysaccharid = Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat usw.).

2.1.2 Struktur und Funktionen

Obwohl nur 11, der in der Natur vorkommenden über 150 Monosaccharide, als Bausteine der Glycoproteine gefunden werden, ist die Variationsbreite der Strukturen, die von diesen gebildet werden können, im Vergleich zu Proteinen oder Nucleinsäuren, gewaltig. Aus drei Molekülen der gleichen Hexose lassen sich theoretisch 176 Trisaccharide aufbauen, während drei gleiche Aminosäuren oder Nucleotide nur ein Tripeptid bzw. ein Triplett-Codon ergeben (Berger et al., 1982). Entsprechend weit hinkte lange Zeit die Strukturklärung der komplizierten Oligosaccharid-Ketten, denen

der Proteine oder Nucleinsäuren hinterher. Erst durch moderne Methoden wie GC/MS, die Verwendung hochspezifischer exo- und endo-Glycosydasen und besonders durch die hochauflösende ^1H -NMR-Spektroskopie war es in den letzten 4-5 Jahren möglich, eine Fülle von Oligosaccharidstrukturen aus Glycoproteinen zu bestimmen (Vliegenhardt et al., 1983).

Kohlenhydrate in Glycoproteinen sind entweder an einen Asparaginrest (N-glycosidisch) (Johansen et al., 1961) oder an ein Serin bzw. Threonin (O-glycosidisch) (Tanaka et al., 1964) gebunden.

O-glycosidisch gebundene Zuckerketten besitzen sehr heterogene, kaum klassifizierbare Strukturen. Sehr verbreitet ist ein Disaccharid-core der Zusammensetzung:



das in einigen Fällen durch repetitive GlcNAc-Gal-Einheiten verlängert werden kann (Oates et al., 1974). Zusätzlich kommen noch Galactose und Mannose (besonders in Hefe-Glycoproteinen (Nakajima & Ballou, 1974)) häufiger als innerste Zucker vor. Am terminalen Ende der, im allgemeinen nur 2-6 Saccharide langen, O-glycosidischen Ketten, findet man außer den genannten noch N-Acetylneuraminsäure und Fucose.

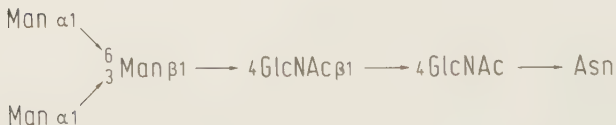


Abb. 1: Kleinste gemeinsame Struktureinheit aller N-glycosidischen Oligosaccharide

N-glycosidisch gebundene Oligosaccharide zeigen größere Gemeinsamkeiten und sind alle aus einem Pentasaccharid-Kern (Abb. 1) aufgebaut. Je nach Substitution dieses innersten Oligosaccharids unterscheidet man drei Subgruppen (siehe auch Abb. 4):

High-Mannose Typ (Kornfeld & Kornfeld, 1976):

Variation in Zahl und Ort der Mannosereste (meist 1 $\rightarrow$ 2), die am inneren Pentasaccharid sitzen.

Komplex Typ (Kornfeld & Kornfeld, 1976):

Bestehend aus variablen äußeren Ketten, die an GlcNAc₂Man₃ gebunden sind und aus Gal, GlcNAc, Sial und/oder Fuc bestehen. Das innerste GlcNAc ist oft fucosyliert.

Hybrid Typ (Tai et al., 1977):

Eine α -Man der biantennären Struktur des Kern-Pentasaccharids ist durch GlcNAc bzw. Gal-GlcNAc besetzt, während die 2. α -Man 1 $\rightarrow$ 2 α -Man-Reste trägt.

Eine besondere Komplikation bei Strukturuntersuchungen an isolierten Glycopeptiden liegt in einer sehr oft beobachteten Uneinheitlichkeit der Zuckerketten. Diese Mikroheterogenität (Gallagher & Corfield, 1978) wird durch nicht kompletterte Oligosaccharide oder durch Austausch von terminalen Zuckern verursacht.

Erst in den letzten Jahren setzten sich, basierend auf sehr detaillierten Strukturinformationen, Konzepte durch, die die Funktionen von Glycoproteinen nicht nur als Strukturkomponenten, sondern auch in der Informationsvermittlung durch bestimmte Kohlenhydratsequenzen sehen (Gottschalk, 1972). Zwar wird für viele glycosylierte Enzyme die biologische Aktivität auch im nichtglycosylierten Zustand (z.B. durch Blockierung der Glycosylierung mit dem Antibiotikum Tunicamycin) konserviert (Nakamura et al., 1976; Mizhari et

al.,1978 Schwaiger et al.,1982), ebenso ist jedoch für eine Vielzahl von Beispielen eine physiologische Funktion der Oligosaccharidketten gesichert.

Kohlenhydrate können eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung und Stabilisierung der Tertiärstruktur spielen. Unglycosyliertes G-Protein des VSV-Virus zum Beispiel aggregiert intrazellulär und blockiert das Virus-"Assembly" (Gibson et al.,1979). Glycane schützen außerdem vor proteolytischem Abbau (Meyer et al.,1975) und haben großen Einfluß auf die Permeabilität von Membranen für Ionen und Metaboliten (Olden et al.,1979).

Neben solchen direkten Proteinstruktur-Einflüssen als Antwort auf die Frage, wie Proteine in ihren Eigenschaften durch gebundene Zuckerreste verändert werden, muß man die wohl wichtigste Funktion im biologischen Bereich, nämlich als Erkennungssignale, suchen. Wahrscheinlich sind Oligosaccharidketten zumindestens mitverantwortlich für das Determinieren des "Routing", d.h. der Lösung des Problems, welche Proteine nach Fertigstellung als sekretorische Proteine ausgeschleust oder als Membranproteine in verschiedenen Zellkompartimente integriert werden.

Zelle-Molekül-Wechselwirkungen zwischen spezifischen Kohlenhydrat-Sequenzen auf einem löslichen Protein und Zelloberflächen führen zur selektiven Bindung von Glycoproteinen. Diese Wechselwirkung stellt den ersten Schritt bei der Rezeptor-vermittelten Endocytose dar (Palade, 1975; Rothman, 1980). Spezifische Erkennungssysteme existieren für Galaktose (Morell et al.,1968), Fucose (Prieels et al.,1978) Glucosamin, Mannose (Stahl et al.,1978) und Mannose-6-phosphat (Neufeld et al.,1975). Glycoproteine mit einem dieser Zucker in terminaler Stellung werden durch Membranrezeptoren z.B. auf Makrophagen erkannt und dem zirkulatorischen System entzogen.

Baynes und Mitarbeiter (Day et al., 1980) vermuten im mannosenspezifischen Rezeptorsystem einen fundamentalen Reaktionsweg der Immunologie. Bei der Immunglobulin-Antigen-Bindung werden Mannosereste des Immunglobulins stärker nach außen exponiert, was als Signal für die schnelle Entfernung des Ak/Ag-Komplexes aus der Blutbahn wirken könnte. Schon lange bekannt ist, daß Oligosaccharide die immunodeterminanten Strukturen für die Blutgruppen A, B und H sind (Watkins & Morgan, 1952).

Zuckerreste auf der Zelloberfläche spielen weiterhin eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-, Zell-Virus- und Zell-Bakterien-Wechselwirkungen. Adhäsive Eigenschaften sind bei Säugerzellen essentiell für die normale Morphogenese und Differenzierung. Die Adhäsion der Zellen untereinander, auf künstlichen und natürlichen Substraten, die für die zelluläre Morphologie, normales Wachstum und Inhibition der Transformation entscheidend ist, wird durch Glycoproteine (bes. Fibronectin) vermittelt (Vaheri et al., 1978; Snider et al., 1980).

2.1.3 Synthese von O-glycosidischen Oligosacchariden

Zuckerketten, die über Serin/Threonin an ein Protein gebunden sind, entstehen durch direkte sequentielle Addition von GalNAc, Gal, Sial, Fuc und Man über die aktivierten Nucleotidzucker unter Mitwirkung von Glycosyltransferasen (Hanover et al., 1980). Evidenzen für einen direkten Zuckertransfer sind das Fehlen sowohl einer Inhibition durch Tunicamycin als auch einer Stimulation durch Dolichylphosphatzusatz, Effekte, die für die lipidgebundene Oligosaccharidsynthese (siehe 2.1.4) typisch sind. Eine Ausnahme bilden die gut untersuchten Mannoproteine aus Hefe (Babczinski & Tanner, 1973; Sharma et al., 1974), bei denen die erste direkt an Ser/Thr gebundene Mannose als Dolichyl-P-Mannose übertragen wird, alle anderen (bis zu 50) direkt über GDP-Mannose.

Bis jetzt wurde die 1968 aufgestellte "one linkage - one enzyme"-Hypothese (Hagiopan & Eylar, 1968), die besagt, daß für jede glycosidische Bindung im Oligosaccharid eine hochspezifische Glycosyltransferase benötigt wird, in allen Fällen, in denen angereicherte Transferasen zur Verfügung stehen, bestätigt (Beyer et al., 1981). Anscheinend werden im Falle der O-Glycoside je nach Spezifität der Glycosyltransferase alle möglichen Oligosaccharidstrukturen verwirklicht, wobei das Produkt einer Glycosyltransferasereaktion als Substrat der nächsten benutzt wird. Dabei beobachtet man oft sogenannte "dead-end products", die einen Seitenweg einer Transferase darstellen und von der nächsten nicht mehr als Substrat akzeptiert werden (Schachter & Roseman, 1980).

Kontrolle der Synthese O-glycosidischer Zuckerketten findet über die Expression von Menge und Typ an Glycosyltransferasen und das Angebot an Nucleotidvorläufern statt. Zum Beispiel wurde in der Submaxillardrüse des Schafs verglichen mit der des Schweins ein ca. 30 mal höheres Verhältnis von Sialyltransferase:Galactosyltransferase gefunden, entsprechend haben 95% der O-glycosidischen Oligosaccharide im Schaf die Sequenz Ser/Thr-GalNAc-Sial, während beim Schwein die Sequenz Ser/Thr-GalNAc-Gal überwiegt (Schachter et al., 1971).

Außer der OH-Gruppe im Serin bzw. Threonin scheint keine weitere spezifische Sequenz in der Umgebung der Glycosylierungsstelle notwendig zu sein, um die Oligosaccharid-Synthese zu starten. Da jedoch nicht alle existierenden Ser/Thr Aminosäuren mit Zuckern besetzt sind, nimmt man an, daß die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins so beschaffen sein muß, daß keine sterische Hinderung zur Glycosyltransferase auftritt (Hill et al., 1977)

Zur subzellulären Lokalisation der O-Glycosylierung und damit der Frage, ob diese co- oder posttranslational abläuft, gab es widersprüchliche Ergebnisse (Strous et

al.,1979; Ruddon et al.,1981). Für eine posttranslationale Oligosaccharidsynthese sprechen jedoch sowohl kinetische Daten aus pulse-chase Experimenten (Hanover et al.,1982), als auch die Tatsache, daß die UDP-GalNAc:Polypeptidtransferrase, die den ersten Reaktionsschritt für viele O-Glycoside katalysiert, hochangereichert im SER und Golgi zu finden ist (Hanover et al.,1980). Von Bedeutung in diesem Zusammenhang ist hier auch noch, daß der Golgi-Komplex, im Gegensatz zum RER für einige Nucleotide (z.B. UDP-Gal, CMP-Sial) permeabel ist, wichtige Vorstufen zur Synthese der Kohlenhydratketten also zur Verfügung stehen (Carey & Hirschberg, 1981; Fleischer, 1981).

2.1.4 Synthese von N-glycosidischen Oligosacchariden

Dol-P-Zyklus

Im Gegensatz zum direkten Zuckertransfer im Fall der O-glycosidisch gebundenen Oligosaccharide, verläuft die Synthese von N-Glycosiden unter Beteiligung von lipidgebundenen Zwischenstufen. Die hervorragenden Arbeiten der Gruppe um Luis LeLoir, die als erste die direkte Beteiligung des Isoprenoids Dolichol an der Glycoprotein-Biosynthese nachwiesen (Behrens & LeLoir, 1970), führten letztendlich zur Etablierung des sogenannten Dolichylphosphat-Zyklus (Abb. 2).

Unter Dolicholen versteht man eine ganze Gruppe von Isoprenoid-Alkoholen, die aus 16-22 Isopren-Einheiten mit isolierten cis-Doppelbindungen und einem α -gesättigten Ende bestehen. Sie wurden zuerst von Morton und Mitarbeitern (Burgos et al.,1963) in der nicht verseifbaren Fraktion von biologischem Material gefunden und kommen in allen eukaryontischen Organismen vor. Dolichole werden durch Kopf/Schwanz-Kondensationen von Isopreneinheiten aus Mevalonat synthetisiert (Richards & Hemming, 1972; Martin & Thorne, 1974). Das eigentlich aktive Substrat für die Glycosylierung ist

Dolichylphosphat, das entweder direkt aus Dolichyl-pyrophosphat, dem Endprodukt der de novo-Synthese, durch eine spezifische Pyrophosphatase (Appelkvist et al., 1981), oder aus dem freien Alkohol durch Phosphorylierung über eine CTP-abhängige Kinase (Allen et al., 1978) bereitgestellt wird.

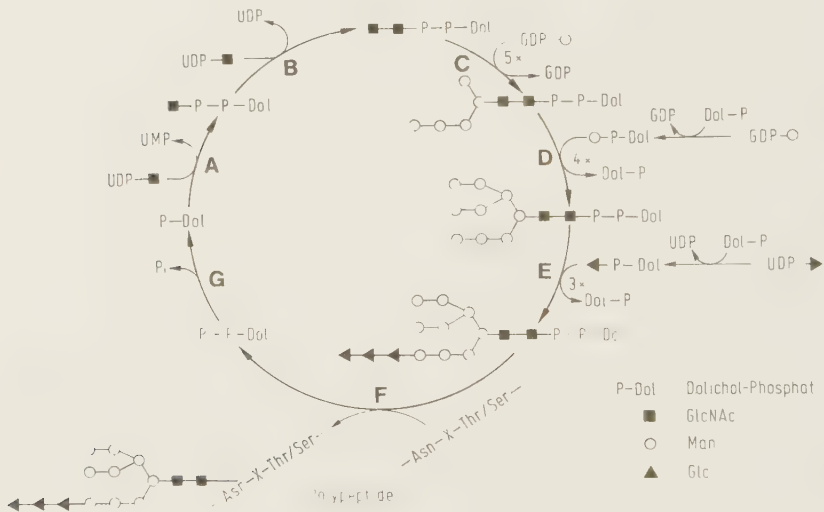


Abb. 2: Dolichylphosphat-Zyklus (nach Hemming, 1983)

Die erste Reaktion des Dol-P-Zyklus (A) besteht in der Umsetzung von UDP-GlcNAc mit Dol-P zum Dol-PP-GlcNAc (Molnar et al., 1971). Diese wird spezifisch durch Tunicamycin, ein in der Glycoprotein-Forschung sehr häufig eingesetztes Antibiotikum blockiert (Tkacz & Lampen, 1975). Nach Addition eines weiteren GlcNAc-Restes über den Nucleotidzucker (B), werden 5 Mannose-Reste ebenfalls über GDP-Mannose als aktivierte Vorstufe addiert (C), wobei die erste Mannose als

β -, die anderen als α -Anomer vorliegen (siehe Abb. 1). Evidenzen dafür sind das Fehlen einer Stimulierung der Dol-PP-GlcNAc₂Man₅-Bildung durch Dol-P, sowie die Inaktivität von exogenem Dol-P-Man als Substrat der Mannosylierung (Levy et al., 1974). Eine Lymphoma-Zellmutante, die defekt in der Dol-P-Man-Synthese ist, reichert als größtes Lipidintermediat dasjenige mit 5 Mannosen an (Chapman, 1980). Für die restlichen vier α -Mannosen (D) wird daher der Transfer über Dol-P-Man als Lipidintermediat, das selbst wieder aus Dol-P und GDP-Man gebildet wird, postuliert (Chambers et al., 1977; Rearick et al., 1981). Transfer dreier Glucose-Reste über Dol-P-Glc (E) komplettiert das Dolichylpyrophosphat-Oligosaccharid (Spiro & Spiro, 1976). Es folgt en bloc-Transfer dieses 14er-Oligosaccharids (Abb. 3) auf einen Asparaginrest des Proteins (F) und Regeneration des Dol-P durch eine spezifische Pyrophosphatase (G).

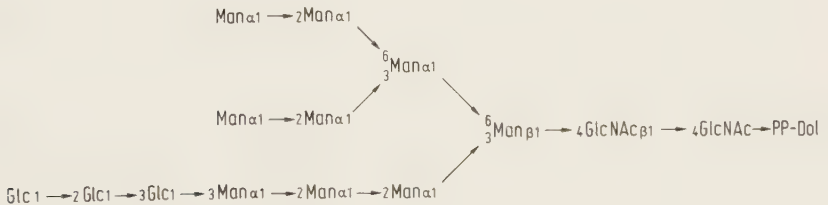


Abb. 3: Struktur des lipidgebundenen Oligosaccharids

Processing

In einer Serie von, noch nicht in allen Einzelheiten bekannten, "Trimming" und "Processing" Reaktionen entstehen aus dem GlcNAc₂Man₉Glc₃-Vorläufer die reifen N-Glycoproteine (Abb. 4).

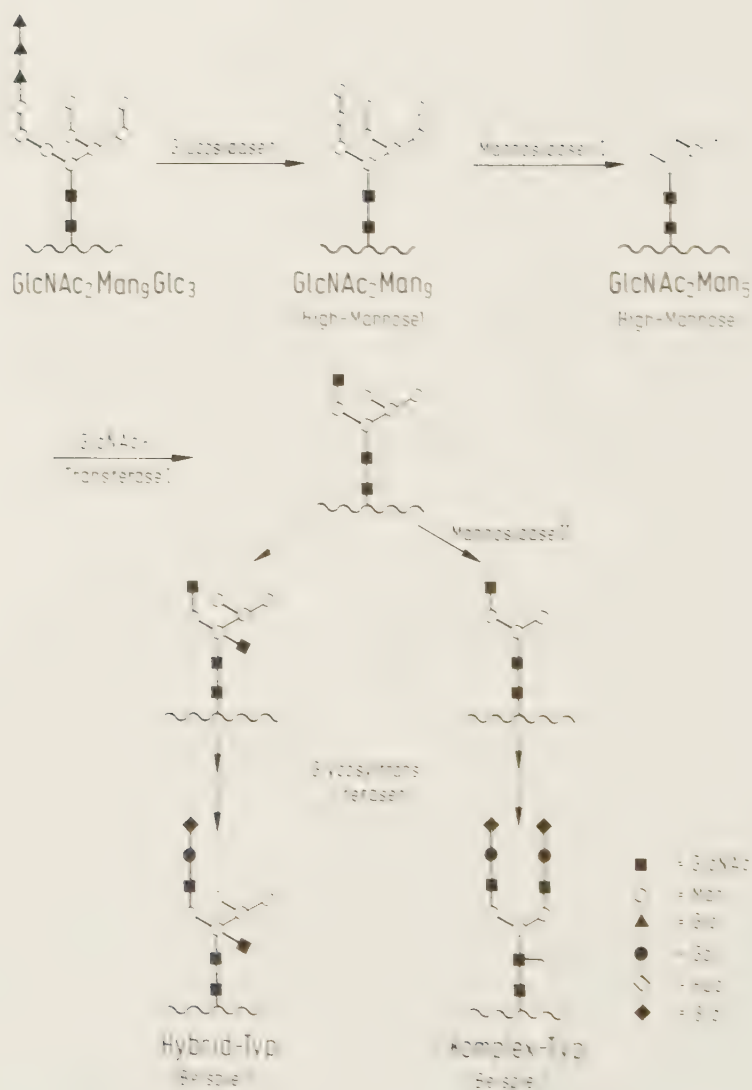


Abb. 4: Oligosaccharid-Processing (nach Smiley et al., 1982)

Durch den Eingriff von mindestens zwei Glucosidasen werden dabei alle 3 Glc-Reste wieder abgespalten (Grinna & Robbins, 1979). High-Mannose-Oligosaccharide der Struktur $\text{Asn-GlcNAc}_2\text{Man}_{5-9}$ entstehen nun durch Abspaltung von bis zu 4 Mannosen durch Mannosidase I (Tulsiani, 1982). Als zusätzliche Modifikation des High-Mannose-Typs findet man Phosphorylierung einer Mannose zu Man-6-P (Kaplan, 1977; Natowicz, 1979). Diese verläuft über Addition von GlcNAc-P aus UDP-GlcNAc an Man und anschließende Abspaltung von GlcNAc (Hasilik et al., 1980). Man-6-P funktioniert wahrscheinlich als Marker, der lysosomale Glycoproteine an ihren Bestimmungsort dirigiert (Neufeld, 1980).

Weiteres Prozessieren zu Komplex-Oligosacchariden findet nur statt, wenn im Man_5 -Stadium ein GlcNAc addiert wird (Tabas & Kornfeld, 1979). Das Produkt der GlcNAc-Transferase I dient als Ausgangspunkt für Hybrid-Kohlenhydratstrukturen (es enthält noch 2 nicht-core Mannosen). Die Addition eines weiteren GlcNAc an die innerste β -ständige Mannose scheint als Signal für stabile Hybridstrukturen zu wirken (Harpaz & Schachter, 1980)

Ohne dieses Signal werden die beiden nicht-core-Mannosen von Mannosidase II abgespalten. Addition von terminalen Zuckern aus den Nucleotidvorstufen unter Mitwirkung diverser GlcNAc-, Gal-, Fuc- und Sialyl-Transferasen führt zu den vielfältigen Strukturen der Komplex-Typ-Glycoproteine. Die Mechanismen der terminalen Glycosylierung ähneln dabei denen, die für die Synthese von O-Glycosiden postuliert werden (Beyer et al., 1979)

Topographie

Der Zusammenbau des dolicholgebundenen Oligosaccharids findet im RER statt. Die Substrate dieser Synthese, die Zuckernucleotide, werden jedoch im Cytoplasma gebildet (Coates et al., 1980) und besitzen keine meßbare Durchdrin-

gungsrate durch Membranen (McCloskey & Troy, 1980); folglich lassen sich Zuckernucleotide in geschlossenen mikrosomalen Vesikeln nicht nachweisen (Hanover & Lennarz, 1982). Da neu synthetisierte lipidgebundene Oligosaccharide auf der luminalen Seite des RER gefunden werden (Snider & Robbins, 1982), wird als Modellvorstellung angenommen, daß eine Kopplung des Nucleotid-Tranfers durch die ER-Membran an die Synthese des Oligosaccharids gegeben ist.

Tanner und Mitarbeiter wiesen nach, daß zumindestens in einem liposomalen in vitro-System, bestehend aus partiell gereinigter Hefe-Dol-P-Man-Synthase, Dol-P und mit GDP beladenen Vesikeln, Dol-P-Man als Mannosecarrier durch Membranen wirken kann (Haselbeck & Tanner, 1982). Bietet man diesem System GDP-(^{14}C)-Man von außen an, erhält man über reversible Dol-P-Man-Synthase eine Anreicherung von GDP-(^{14}C)-Man im Innern, das jetzt durch direkten Zuckertransfer Glycosylierungen ermöglichen könnte. Diese Reaktion könnte zumindestens im Spezialfall der Hefe-Mannoproteine eine Rolle spielen, obwohl die damit maximal erreichbare Mannosylierungsrate weit hinter der in vivo gemessenen zurückliegt (Tanner et al., 1982).

Transfer des fertigen Oligosaccharids auf das Protein erfolgt als cotranslationaler Prozess, sobald die für die Glycosylierung notwendige Sequenz Asn-X-Ser/Thr für die entsprechende Transferase zugänglich ist (Glabbe et al., 1980). Die Abspaltung der Glucose-Reste findet ebenfalls noch im ER statt (Spiro et al., 1979). In pulse-chase-Experimenten findet man für die Abtrennung der ersten Mannose eine lag-Phase von 10 min. (Hubbard & Robbins, 1980), die für den Transport des Asn-GlcNAc₂Man₉-Glycoproteins vom ER in den Golgi verantwortlich sein könnte. Alle nachfolgenden, am Prozessieren beteiligten Enzyme (Mannosidasen, terminale Glycosyltransferasen) sind im Golgi-Apparat lokalisiert.

Regulation

Vieles deutet darauf hin, daß die Konzentration an Dol-P als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wirkt. So führt die Inhibition des an der Dolichol-Biosynthese beteiligten Enzyms HMG-CoA-Reductase zur Blockierung der Lipid-Oligosaccharid-Synthese (Carson & Lennarz, 1978). Außerdem lassen sich durch Zusatz von Dol-P GlcNAc- und Man-Einbauraten in Gewebsstücke aus verschiedenen Quellen um das 2-3 fache erhöhen (Carson et al., 1981).

Die Untersuchung der Frage, warum 3 Glucosen im lipidgebundenen Oligosaccharid addiert und nach Transfer auf das Protein sofort wieder entfernt werden, führte zu einem weiteren Regulationspunkt. Bei in vitro-Versuchen kann nur das vollglucosylierte Oligosaccharidlipid effizient auf das Protein übertragen werden (Spiro et al., 1979). Während Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₂ minimale Transferaktivität zeigt, führt die Abspaltung der 4 peripheren, nichtglucosylierten Mannosen aus dem 14er-Oligosaccharidlipid (siehe Abb. 3) nicht zur Verringerung der Transferrate.

Da nicht jedes Asn in der zur Glycosylierung notwendigen Proteinsequenz Asn-X-Ser/Thr glycosyliert ist (Struck & Lennarz, 1980), glaubt man, daß wie im Fall der O-Glycoside, die sterische Zugänglichkeit der Asn-Reste eine Rolle spielt. Hinweise hierfür sind die Glycosylierung von, in nativem Zustand nicht glycosylierten, Sequenzen nach Denaturierung (Pless & Lennarz, 1977) und Vorhersagen aus Proteinsequenz-Analysen, daß viele Oligosaccharidketten an exponierten β -Faltblättern oder Schleifen lokalisiert sind (Aubert et al., 1976).

2.2 Retinol

2.2.1 Biosynthese und Metabolismus

Retinol oder Vitamin A (Abb. 5) stellt die Stammverbindung einer Klasse von Molekülen dar, die als Retinoide bezeichnet werden.

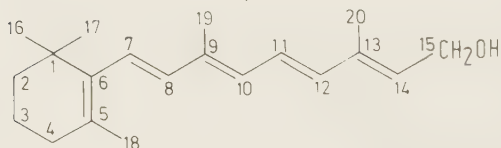


Abb. 5: Struktur von all-trans Retinol

(9,13-Dimethyl-7-(1,1,5-Trimethyl-6-Cyclohexen-5-yl)
7,9,11,13-nonatetraen-15-ol)

Modifikationen an den 3 Strukturelementen des Retinols (Cyclohexenring, konjugierte Seitenkette, polare Endgruppe) führen zu einer Reihe natürlich vorkommender und chemisch synthetisierter -bis 1981 über 1000 Derivate (Bollag & Matter, 1981)- Retinoide.

Retinol wurde schon 1916 als lebenswichtiger Stoff in tierischen Fetten und Fischölen gefunden und als "fettlösliches A" (McCollum & Kennedy, 1916), wenig später als Vitamin A bezeichnet (Drummond, 1920). 1928 wurde die hohe Vitamin A-Aktivität des β -Carotins entdeckt (v.Euler et al., 1928), bald darauf gelang Karrer die Strukturaufklärung sowohl des

β -Carotins als auch des Vitamin A (Karrer et al., 1930; Karrer et al., 1931). Die erste Totalsynthese des Retinols wurde von Isler im Jahre 1947 publiziert (Isler et al., 1947).

Tierische Organismen nehmen Vitamin A entweder als von Pflanzen synthetisiertes β -Carotin (Provitamin A) oder direkt als Retinylester aus tierischer Nahrung auf. β -Carotin wird nach Absorption im Darm oder Leber durch β -Carotin-15,15-oxygenase (Olson & Hayaishi, 1965) an der zentralen Doppelbindung zu 2 Molekülen Retinal gespalten, die sofort zu Retinol reduziert werden (Goodman & Huang, 1965). Dieses wird anschließend mit langkettigen Fettsäuren (hauptsächlich Palmitinsäure) verestert (Goodman et al., 1966), über den lymphatischen Weg an Chylomikronen gebunden, in die Leber befördert und dort gespeichert (Huang & Goodman, 1965). Im Falle der Aufnahme als Retinylester werden diese durch spezifische Esterasen gespalten (Ganguly, 1969), bevor die Absorption im Darm stattfinden kann. Dort erfolgt weitere Metabolisierung wie die des aus β -Carotin stammenden Retinols.

Die Mobilisierung des Retinols aus dem Leberpool erfolgt, nach Hydrolyse der Retinylester, in hochkontrollierter Weise durch Bindung freien Retinols an ein spezifisches Plasma-Transportprotein (RBP), das von der Leber synthetisiert wird (Kanai et al., 1968). Nach Sekretion des holo-RBP in den Blutkreislauf, bindet dieses spezifisch an Präalbumin (Kanda et al., 1974) und transportiert Retinol als 1:1-Komplex zu den Zielorganen. Diese RBP-Bindung stellt für den Organismus einen wichtigen Schutz vor dem hochtoxischen, membranaktiven freien Retinol dar (Dingle et al., 1972).

Holo-RBP bindet mit großer Affinität (10^{11} M^{-1}) an Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen (Heller, 1975). Nach Transfer des Retinols durch die Zellmembran verliert das apo-RBP seine Rezeptorbindungsfähigkeit, spaltet auch Präalbumin ab und wird abgebaut (Rask & Peterson, 1976).

In der Zelle angelangt, wird Retinol von einem intrazellulären Retinol-bindenden Protein (CRBP) übernommen (Bashor & Chytil, 1975), das sich in seinen physikalischen Eigenschaften, in der AS-Sequenz, vor allem aber in der viel höheren Bindungsspezifität von Plasma-RBP unterscheidet (Rask et al., 1981). CRBP kann an die Kernmembran binden und transportiert möglicherweise Retinol in den Zellkern (Takase et al., 1979).

Ein Hauptmetabolit des Retinols, Retinsäure, wird zwar von Plasma-RBP in vitro gebunden (Goodman & Raz, 1972), aber in vivo nicht von RBP, sondern von Serumalbumin transportiert (Smith et al., 1973). Neben CRBP wurde ein weiteres hochspezifisches, cytosolisches Bindungsprotein für Retinsäure (CRABP) isoliert und charakterisiert (Ong & Chytil, 1976), das nach Sani die Aufnahme der Retinsäure in den Zellkern vermitteln kann (Sani & Donovan, 1979). In der Retina des Auges konnte ein zelluläres Bindungsprotein mit Spezifität für Retinal (CRALBP) nachgewiesen werden (Stubbs et al., 1979).

Metabolisierung der Retinoide beinhaltet Oxidation des Retinols über Retinal zur Retinsäure. Während der erste Oxidationsschritt reversibel ablaufen kann, wurde noch keine reduktive Metabolisierung der Retinsäure in vivo gefunden (Zile & Cullum, 1983). Retinsäure kann von keinem Organ in nennenswerter Weise gespeichert werden und wird rasch über Zwischenstufen, die polarere Derivate (Zile & DeLuca, 1968), aber auch cis/trans-Isomere sein können, abgebaut. Bekannte Metabolisierungsprodukte sind 4-Oxo-, 4-Hydroxy- (Frolik et al., 1979), 5,6-Epoxyretinsäure (McCormick et al., 1980), Retinoylglucuronid (Zile et al., 1982) und 13-cis-Retinsäure (Frolik et al., 1980).

2.2.2 Funktionen

Retinoidwirkungen auf molekularer Ebene sind nur an zwei Systemen annähernd verstanden. Im Sehprozess wirkt Retinal, dessen Photoisomerisierung vom 11-cis zum all-trans den entscheidenden Schritt zur Lichtabsorption darstellt, als aktives Retinoid (Wald, 1960). Retinol ist als Zwischenstufe bei der Regeneration des 11-cis Retinals beteiligt (Wald, 1968), Retinsäure dagegen ist völlig inaktiv (Dowling & Wald, 1960). In Halobakterien wirkt ebenfalls Retinal als Chromophor des Bakteriorhodopsins, einer lichtgetriebenen Protonenpumpe (Oesterhelt, 1976), und des Halorhodopsins, einer Chloridpumpe (Schobert & Lanyi, 1982).

Befunde über physiologische Retinoid-Wirkungen stammen entweder aus Zuständen des Vitamin A-Defizits oder -Überschusses. Aus diesen Untersuchungen läßt sich ein Vitamin A-Einfluß auf mindestens fünf weitere Gebiete ableiten, nämlich Wachstum, Differenzierung, Reproduktion, Immunsystem und Kanzerogenese (siehe Abb. 6).

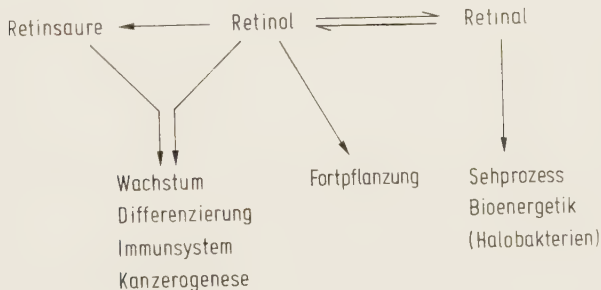


Abb. 6: Retinoidwirkungen (nach Pawson, 1981)

Vitamin A-frei gehaltene Tiere zeigen eine enorme Vielfalt von Ausfällen. Dazu gehören die Verringerung der Nahrungsaufnahme und damit ein starker Gewichtsverlust (Anzano, 1979), Verhornungen der Kornea, die im fortgeschrittenen Stadium zu völliger Blindheit führen (Moore et al., 1935), außerdem Keratinisierung von Epithelgeweben (Wolbach & Howe, 1925) und Defekte des Knochenwachstums. Die Fortpflanzungsfähigkeit ist gestört (Evans & Bishop, 1922), da Spermatogenese und Ausbildung der Ovarien unterdrückt und bereits gebildete Föten wieder resorbiert werden. Die stärksten Vitamin A-Einflüsse beobachtet man also an sich schnell teilenden Zellen, z.B. Embryonal-, Epithel- oder Samenzellen.

Alle diese Effekte können durch Zugabe von Retinol oder Retinsäure revertiert werden, mit Ausnahme der Fortpflanzungsfähigkeit, die spezifisch retinolabhängig ist, d.h. von Retinsäure nicht wiederhergestellt werden kann (Thompson et al., 1964). Experimente in keimfreier Umgebung zeigten, daß ein Überleben auch ohne Vitamin A möglich ist (Bieri et al., 1969), der oftmals beobachtete Tod der Versuchstiere also auf sekundäre Effekte, z.B. die Suppression der Immunabwehr zurückgeht (Hof & Wirsing, 1979).

Auf zellulärer Ebene wird der wachstumsregulierende Effekt von Retinoiden mit Zellkulturtechniken intensiv untersucht. Auf die Schwierigkeiten, sowohl bei der Erzeugung von retinolfreiem Medium, als auch beim Arbeiten mit unphysiologisch hohen Retinolkonzentrationen wird in einer neueren Arbeit aus unserem Labor eingegangen (Holst & Oesterheld, 1983). Dementsprechend sind die publizierten Ergebnisse aus in vitro-Zellkultur-Experimenten sehr divers. Es wurden sowohl Wachstumsinhibition (z.B. Jetten et al., 1979) als auch Wachstumsstimulation (z.B. Schroder et al., 1982) gefunden. Retinoide scheinen jedoch die Zelladhäsion und damit das "anchorage-dependent" Wachstum zu vermitteln (Lotan et al., 1982).

Dagegen ist der Einfluß von Retinoiden auf die Zelldifferenzierung nicht umstritten, weil für die Untersuchung dieses Problems sehr gut geeignete Modellsysteme zur Verfügung stehen. Die terminale Differenzierung von Epiderm-Zellen (Fuchs & Green, 1981) zum Beispiel wird strikt durch Retinoide kontrolliert (siehe Kap. 2.3.1). Bei embryonalen Karzinomazellen (z.B. Zelllinie F9), die in Zellkultur undifferenziert gehalten werden können, induziert Retinsäure (in geringerem Maß auch Retinol) die Differenzierung zu Endoderm-Zellen (Strickland & Mahdari, 1978). Diese Differenzierung wird von einer dramatischen Erhöhung der Hyaluronsäuresynthese begleitet (Prehm, 1980), die wahrscheinlich für die veränderte Morphologie der Zellen mitverantwortlich ist.

Die Entwicklung zu malignen Zellen versteht man heute als Verlust von Differenzierungs- und Wachstumskontrolle (Butschak, 1976). Da Retinoide, neben Steroidhormonen und Wachstumsfaktoren, zu den wenigen physiologischen Substanzen gehören, die diese Vorgänge steuern können, wurde ihre antikarzinogene Aktivität in den letzten Jahren intensiv untersucht (Sporn et al., 1976; Sporn & Newton, 1979). Retinoide sind in der Lage die Tumorbildung nach Verabreichung sowohl chemischer als auch viraler Karzinogene zu unterdrücken, Effekten von Tumorpromotoren (z.B. Phorbol-ester) entgegenzuwirken und in manchen Fällen sogar die Rückbildung solider, transplantabler Tumoren zu bewirken (Review: Lotan, 1980). Allerdings sind die natürlichen Retinoide oft nur in hohen, toxischen Dosen aktiv, was zu einer intensiven Suche nach synthetischen Retinoiden mit geringerer Toxizität und höherer therapeutischer Wirkung geführt hat (Bollag & Matter, 1981). Mittlererweile werden Retinoidderivate schon in klinischen Tests als Krebstherapeutika eingesetzt.

Die toxische Wirkung bei Retinoid-überschuß beruht wahrscheinlich auf der extrem hohen Membranaktivität dieser

Substanzen (Fell & Dingle, 1967). Dabei führt der Einbau von freien Retinoiden zur Störung der nativen Membranstruktur, was eine drastische Erhöhung der Permeabilität und damit die Aufhebung der Kompartimentierungsfunktion der Membran bewirkt (Goodall et al., 1980).

2.3 Hypothesen zum molekularen Mechanismus der Retinoidwirkung

Von vielen Modellen, die im Laufe der Zeit zur Retinoidwirkung entwickelt wurden, werden nur noch die Hormontheorie (nukleare Funktion) und die Hypothese einer Beteiligung an der Glycoprotein-Biosynthese (extranukleare Funktion) diskutiert.

2.3.1 Hormontheorie

Die Entdeckung der intrazellulären Retinol- bzw. Retinsäurebindenden Proteine durch Ong und Chytil (siehe 2.2.1) führte 1973 zur Hypothese eines Retinoidwirkmechanismus, der dem bekannten Schema für Steroidhormone entlehnt wurde (Bashor et al., 1973). Analog zu den Steroiden existiert auf der Oberfläche von Zielzellen ein spezifischer Rezeptor, der RBP bindet (Heller, 1975) und Retinol in die Zelle schleust. Bindeproteine in der Zelle sorgen für den Transport zum Kern, wo Retinol wieder über ein Rezeptorsystem eingeschleust werden und als Induktor oder Repressor der Expression verschiedener Gene wirken könnte.

Da Retinoide eindeutig an Differenzierungsvorgängen beteiligt sind und Differenzierung im allgemeinen als zeitabhängige Expression verschiedener Gene verstanden wird (O'Malley & Means, 1974), hat diese Hypothese breite Anerkennung erfahren.

Liau et al. konnten an isolierten Zellkernen autoradiographisch zeigen, daß ^3H -Retinol von CRBP transportiert im Inneren des Zellkerns, freies Retinol dagegen an der Peripherie (Kernmembran) lokalisiert ist (Liau et al., 1981). Unter Vitamin A-Mangel findet man in Ratten reduzierte m-RNA-Synthese, die durch Retinoid-Gaben wieder auf den normalen Wert gesteigert werden kann. In vitro-Translationen dieser m-RNA zeigen erhöhte Produktion einiger Genprodukte, sowie Erniedrigung anderer (Omori & Chytil, 1982), wobei man bei Reversion mit Retinol etwas andere Proteinmuster als mit Retinsäure erhält, was auf spezifische Effekte der beiden am häufigsten untersuchten Retinoide schließen läßt.

Das bislang eindeutigste Beispiel für die Kontrolle der Genexpression durch Retinoide ist die Inhibition der Differenzierung von Epidermiszellen in Kultur (Fuchs & Green, 1981) durch Repression und Induktion spezifischer m-RNA-Moleküle. Menschliche Keratinocyten können unter normalen Zellkultur-Bedingungen passagiert werden, unter retinolfreien Bedingungen allerdings tritt Keratinisierung ein. Diese geht mit dem Auftauchen eines spezifischen Keratins einher, welches durch Zugabe von Retinylacetat wieder verschwindet. Genau dieses 67 kD-Keratin findet man bei in vitro-Translationen von m-RNA aus retinolfreien Zellen, während m-RNA aus normalen Zellen kein Protein in diesem Bereich translatiert.

Obwohl in diesen Fällen die Retinoidwirkung auf die Genexpression gesichert scheint, gibt es viele Hinweise, daß dieser Mechanismus nicht alle Retinoideffekte bewirken kann bzw. nicht in allen Zelltypen verwirklicht ist. So ist retinoidinduzierte Wachstumsinhibition (Lotan et al., 1980), seltener retinoid-kontrollierte Differenzierung (Breitman et al., 1980) ohne nachweisbare Mengen von CRBP und CRABP bekannt. Ebenso existiert der umgekehrte Fall, daß nicht Vitamin A-abhängige Zellen CRBP/CRABP enthalten (Douer & Koeffler, 1982; Haussler et al., 1983).

Ähnlich dem intrazellulären retinalbindenden Protein (CRALBP) der Retina, das bei der Metabolisierung von 11-cis-Retinal zu 11-cis-Retinol beteiligt ist (Saari & Bredberg, 1982), findet man auch bei in vitro-Versuchen mit isolierten Zellkernen rasche Metabolisierung der Liganden von CRBP/CRABP (Cope et al., 1983). Ein weiteres Beispiel sind 3T3-Fibroblasten in denen Retinsäure die Tumorpromotion, gemessen am Verlust von Fibronectin an das Medium, auch in entkernten Zellen hemmt, was einen Mechanismus im Sinne der Hormontheorie nahezu ausschließt (Bolmer & Wolf, 1982)

2.3.2 Direkte Beteiligung von Retinoiden an der Glycoprotein-Biosynthese

In Analogie zu der von Caccam et al. postulierten Beteiligung von Polyprenolen an der Glycoprotein-Biosynthese (Caccam et al., 1969), fanden DeLuca und Mitarbeiter 1970 bei Inkubation von Rattenleber-Mikrosomen mit ^{14}C -Retinol und $\text{GDP-(}^{14}\text{C)-Mannose}$ ein Mannolipid, das nach alkalischer Hydrolyse ein "polares Metabolit des Retinols" ergab (DeLuca et al., 1970), welches später als Retinylphosphat identifiziert wurde (DeLuca et al., 1973). Daraus wurde die Hypothese einer direkten Retinolbeteiligung an der Glycoprotein-Synthese entsprechend folgendem Reaktionsschema entwickelt:



Unterstützung erhielt diese Theorie durch Beobachtungen, daß unter Vitamin A-Mangel der Kohlenhydratgehalt von Glycoproteinen in Zellen verschiedenster Herkunft u.a. Darmschleimhaut (DeLuca et al.,1973), Kornea-Epithel (Kim & Wolf, 1975), Trachea-Epithel (Bonnani et al.,1973) und Leber (DeLuca et al.,1975) stark reduziert ist. Den stärksten Effekt findet man in fast allen Fällen beim Mannoseeinbau, dieser ist wiederum am stärksten in Leberzellen betroffen. So wurde in Hamsterleber unter Vitamin A-Diätbedingungen ein Abfall des in vivo-Einbaus von Mannose in Glycoproteine und Glycolipide von 90% gemessen, Überschuß an Vitamin A ergab 610% Steigerung (Hassell et al.,1978). Besonders gut lassen sich retinoidabhängige Glycoproteinänderungen auch an Zellkulturen beobachten (Yuspa & Harris, 1974; Adamo et al.,1979; Sasak et al.,1980).

In der Folgezeit wurde die Glycoprotein-Hypothese durch den Nachweis der Ret-P-Man-Bildung in vivo (Masushige et al.,1978) und des Mannosetransfers über Ret-P-Man auf endogene Proteinakzeptoren in vitro (Rosso et al.,1977) erhärtet.

Exogen zugesetztes chemisch synthetisiertes Ret-P stimuliert die Ret-P-Man-Synthese in Rattenleber-Mikrosomen 50-fach (DeLuca et al.,1977) und konnte Retinol in biologischen Tests wie Wachstumspromotion (Rosso et al.,1975) und Inhibition der Keratinisierung (Frot-Coutaz et al.,1976) ersetzen. Ebenfalls 1976 konnte Ret-P als Metabolit von ¹⁴C-Retinol in Hamsterepithelzellen nachgewiesen werden. Der Zusatz von BSA ergab in vitro eine starke Steigerung der Ret-P-Man-, nicht jedoch der Dol-P-Man-Aktivität (Shidoij et al.,1981).

Maus-Mastocytozyten synthetisieren in vivo neben Ret-P-Man auch das Galaktosederivat aus UDP-Galaktose (Helting & Peterson, 1972) und können über Ret-P-Gal Galaktose auf endogene Akzeptoren übertragen (Peterson et al.,1976).

Ret-P-Gal-Bildung ließ sich jedoch in Rattenleber-Mikrosomen nicht nachweisen (DeLuca et al., 1977).

Im in vitro-System mit Lebermikrosomen zeigte sich chemisch phosphorylierte Retinsäure völlig inaktiv (DeLuca et al., 1977), in vivo verabreichte Retinsäure ergab jedoch erhöhten Mannoseeinbau in Ret-P-Man und Mannoglycoproteine, während die Dol-P-Man-Synthese unberührt blieb (Sato et al., 1978). Daraus wurde eine Metabolisierung der Retinsäure postuliert, wobei über eine hydroxylierte Zwischenstufe, die phosphorylierbar wäre, Zucker transferiert werden könnten.

Eine weitere wichtige Beobachtung war die Anreicherung kürzerer lipidgebundener Oligosaccharide ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$) statt ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) in Lebern Vitamin A-defizienter Ratten (Rosso et al., 1981). Dies könnte entweder auf eine Beteiligung des Retinols an der lipidgebundenen Oligosaccharid-Synthese oder auf einen Zusammenhang mit der Dol-P-Man-Bildung hindeuten.

Die hier dargestellte Hypothese der Funktion der Retinoide als Zuckercarrier könnte das Eingreifen in Wachstums- und Differenzierungsvorgänge erklären, da diese entscheidend von Zelloberflächen-Wechselwirkungen gesteuert werden (Lotan, 1980) und gezeigt werden konnte, daß Retinoide die Charakteristik von Zelloberflächen über veränderte Glycoprotein-Zusammensetzung beeinflussen können (Jetten, 1980; Lotan et al., 1983). Spezifische retinoid-abhängige Glycosylierung von Membranproteinen könnte zumindest für einen Teil der in Kap. 2.2.2 beschriebenen Effekte verantwortlich sein.

Argumente gegen diese Theorie stützen sich hauptsächlich auf folgende Punkte: Bis jetzt wurde noch kein Phosphatdonator gefunden, der über eine retinolspezifische Kinase in vitro zur Synthese von Ret-P führt. Außerdem ist die Rolle der Retinsäure im Glycoprotein-Modell noch unverstanden; da Retinoylphosphat in vitro keinen Zucker binden kann. Der

wichtigste Einwand besteht jedoch in der Vermutung, die beobachteten Ret-P-Man-Syntheseraten könnten nur eine Seitenreaktion der gut bekannten Dol-P-Man-Synthase im in vitro-Testsystem mit hohem Ret-P-Angebot darstellen. Ein spezifischer retinolabhängiger Glycoproteinakzeptor, der die physiologischen Retinoleffekte erklären könnte, wurde zudem bis jetzt noch nicht identifiziert.

2.4 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, daß ein, vom Dolichylphosphatzyklus unabhängiger Glycosylierungsweg, über Retinolderivate als Zwischenstufen existiert. Als Modellsystem wurde die Rattenleberzelle gewählt, da diese einen sehr starken Retinoleffekt auf die Glycoprotein-Biosynthese aufweist (Hassell et al., 1978). Außerdem eignet sich die Rattenleber besonders auch für Untersuchungen auf subzellulärer Ebene, da gute Methoden für die Isolierung der einzelnen Zellkompartimente beschrieben sind.

Die Spezifität des Retinolweges wurde dabei auf zwei Ebenen untersucht. Auf der Stufe der Bildung des Retinylphosphomannose-Intermediats sollte eine Solubilisierung und Charakterisierung des beteiligten membrangebundenen Enzyms, sowie seine Abtrennung von der entsprechenden Dol-P-abhängigen Mannosyltransferase zum Ziel führen. Untersuchungen des eigentlichen Mannosetransferschritts (Reaktion 3 des Schemas auf Seite 26) und die Charakterisierung der Natur der endogenen Mannoseakzeptoren könnten einen besseren Einblick in den Mechanismus einer Retinolwirkung auf die Glycoprotein-Biosynthese geben.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien und Lösungen

Substrate: Dolichol(C_{80} - C_{90}), Dolichylphosphat, Retinol und Retinsäure waren von Sigma, Taufkirchen.

Detergentien: Brij-Detergentien und Emulphogen waren von Atlas-Chemie, Essen; Triton, Tween und Pluronic von Serva, Heidelberg; alle anderen von Sigma.

Radioaktive Substanzen: Von NEN, Dreieich wurden GDP-(^{14}C)Man (269 mCi/mMol), UDP-(^{14}C)GlcNAc (306 mCi/mMol), GDP-(^{14}C)Fuc (190 mCi/mMol) und UDP-(^{14}C)GalNAc (47.2 mCi/mMol) bezogen. UDP-(^{14}C)Gal (309 mCi/mMol), CMP-(^{14}C)Sial (247 mCi/mMol) und UDP-(^{14}C)Glc (233 mCi/mMol) kamen von Amersham, Braunschweig. NEN lieferte ebenfalls trägerfreies $H_3^{32}PO_4$.

Szintillationslösungen: Rotiszint 22 war von Roth, Karlsruhe Dimilume 30 von Packard, Zürich, Schweiz.

Phospholipide: Alle verwendeten Phospholipide wurden von Sigma geliefert.

HPLC-Lösungsmittel: Acetonitril und Propanol waren von Merck Darmstadt; Methanol von Baker, Philipsburg, USA.

Alle anderen Reagenzien wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von Sigma bezogen.

Puffer: Puffer A 50 mM Tris-HCl p_H 7.6, 25 mM KCl, 5 mM EDTA
5 mM $MgSO_4$, 250 mM Saccharose

Puffer B 5 mM $K-PO_4$ p_H 7.6, 2% Brij 58

Puffer C 5 mM Tris-HCl p_H 7.6, 5 mM $MgSO_4$, 5 mM EDTA
2% Brij 58

Puffer D wie C, jedoch 10 mM Tris-HCl p_H 7.6

3.2 Geräte

UV-Spektroskopie: Cary 210 (Varian, Palo Alto, USA)

Absorptionsmessungen: PM 6 (Zeiss, Oberkochen)

HPLC: Apparatur bestehend aus HPLC-Pumpe 200 (Gynkotheek, München), einem Einspritzventil 7125 (Rheodyne, Cotati, USA), einem Radioaktivitätsmonitor LB 503 (Berthold, Wildbad) und einer RP-Säule Shandon ODS, 5 μ m (Bischoff Stuttgart) für isokratische Läufe. Gradientenläufe wurden mit einem Gradientenmischer 250, einer Pumpe 300 B (Gynkotheek, München) und einem Monitor 2151 (LKB, Bromma, Schweden) durchgeführt.

Szintillationszählung: MR 300 (Kontron, Eching)

DC-Scanning: LB 2723 (Berthold, Wildbad)

3.3 Präparation von Rattenleberfraktionen

3.3.1 Mikrosomale Fraktion

Die Präparation von Rattenlebermikrosomen erfolgte nach der Methode von Fleischer (Fleischer & Kervina, 1974) mit einigen vereinfachenden Änderungen. 10 männliche Wistar-Ratten (200-250g), 24 h gehungert, wurden durch Genickbruch getötet, die Leber nach Ausbluten sofort entnommen und in 5 Vol. eiskalten Puffer A gelegt. Alle weiteren Schritte wurden bei 1-4 °C durchgeführt. Die kleingeschnittenen Leberstücke wurden im 60 ml-Potter 3x 5 sec mit einem weiten und 3x 5 sec mit einem engen Pistill homogenisiert und durch Verbandmull filtriert. Der Überstand nach zwei Zentrifugationen (960 xg für 10 min und 25 000 xg für 10 min) enthält RER, SER, Golgi und Cytoplasma und wurde mit 125 000 xg für 1 h zentrifugiert. Das mikrosomale Pellet wurde in wenig

Puffer A resuspendiert und eine Proteinkonzentration von 30 mg/ml eingestellt.

Eine typische Präparation lieferte 65 g Leber (Feuchtgewicht) mit ca. 11g Protein, davon ca. 1100 mg in Mikrosomen, die in Portionen von 2.5 ml bei -70°C eingefroren wurden. Die Anreicherung der Ret-P-Man-Synthase in Mikrosomen gegenüber dem Homogenat betrug 4 bis 5-fach.

3.3.2 Präparation hochgereinigter Rattenleberfraktionen

Hochangereicherte Rattenleberfraktionen wurden freundlicherweise von Prof. S. Fleischer, Vanderbilt University, Nashville, USA zur Verfügung gestellt. Tab. 1 gibt die Verteilung von Markerenzymen in den einzelnen Fraktionen wider.

Tab. 1: Verteilung von Markerenzymen in einzelnen Rattenleberfraktionen.

Fraktion	Phosphat Protein	Succ-C (Mitos)	5'-AMPase (PM)	CA-CoA (ER)	Gal-trans (Golgi)
Homogenat	20.7	0.057	0.038	--	10.5
Kerne	41.6	0.0029	0.005	1.60	2.9
Plasmamembran	19.3	0.064	0.880	1.30	29.0
Mitos R ₁	10.4	0.446	0.006	0.00	0.9
Mitos R ₂	11.5	0.290	0.119	0.01	0.0
RER	39.7	0.0029	0.044	9.9	16.8
SER	27.8	0.0069	0.230	10.2	134.0
Golgi	19.0	0.006	0.096	0.50	912.0
Cytoplasma	10.3	0.0007	0.008	0.40	2.9

Erläuterungen: Mitos = Mitochondrien; Succ-C = Succinat-Cytochrom c-Reduktase, 5'-AMPase = 5'-Adenosin-monophosphatase, CA-CoA = Cholsäure-CoA-Ligase (alle in $\mu\text{Molxmg}^{-1}\text{xmin}^{-1}$); Gal-Trans = Galactosyltransferase ($\text{nmolxmg}^{-1}\text{xh}^{-1}$).

3.4 Substratsynthesen

3.4.1 Chemische Synthese von Ret-P

Die Synthese von Ret-P erfolgte nach der Methode von Popjak (Popjak et al., 1969), die zur Phosphorylierung von Retinol modifiziert wurde (Sasak et al., 1979; Hemberger, 1980).

a) Bistriethylammoniumphosphat (BTAP)

Ansatz:

10.0 g (0.10 Mol) 85% Phosphorsäure (Merck, Darmstadt)

20.65 g (0.21 Mol) Triethylamin (Merck, Darmstadt)

Durchführung:

10 g H_3PO_4 wurden in 25.6 ml CH_3CN vorgelegt und 20.65 g Et_3N innerhalb 15 min unter Rühren zugetropft. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde noch 1 h im Eisbad gerührt. Kristallisation erfolgte über Nacht im Eisschrank. Die weißen hygroskopischen Kristalle wurden über einen Büchnertrichter abgesaugt und über P_4O_{10} getrocknet.

Ausbeute: 7.31 g (24.4 mMol) Rohprodukt = 25 %

b) Retinylphosphat

Ansatz:

100 mg (0.33 mMol) BTAP

50 mg (0.17 mMol) all-trans-Retinol

Durchführung:

Alle Schritte unter Rotlicht und in N_2 -Atmosphäre.

In einem mit N_2 gespülten Dreihalskolben mit Kühler und Tropftrichter wurden 50 mg Retinol in 12.5 ml CH_3CN und 1.25 ml CCl_3CN (Aldrich, Nettetal) vorgelegt. Dazu tropfte man 100 mg BTAP in 10 ml CH_3CN innerhalb von 15 min und rührte 1 h bei Raumtemperatur. Unter Eisbadkühlung wurde mit genau 5

Tropfen einer halbkonz. NH_3 -Lösung neutralisiert. Nach 5 min Rühren wurde der Niederschlag abzentrifugiert (5 min, 4500 rpm, 0°C) und mit 10 ml eiskalter 99% MeOH gewaschen. Überstand und Waschlösung wurden vereinigt und mit kaltem 99% MeOH auf 250 ml aufgefüllt.

Reinigung:

Der Reaktionsmix in 99% MeOH wurde auf eine im selben Lösungsmittel äquilibrierte DEAE-Sephacelsäule in der Acetat-Form (1 x 15 cm) gepumpt (60 ml/h), anschließend mit 100 ml 99% MeOH, dann mit 100 ml 1 mM NH_4OAc in 99% MeOH gewaschen. Elution erfolgte mit 30 mM NH_4OAc in 99% MeOH mit 30 ml/h (Abb. 7).

Fraktionen mit $E_{325} > 1.5$ wurden vereinigt.

Ausbeute: 15-20%

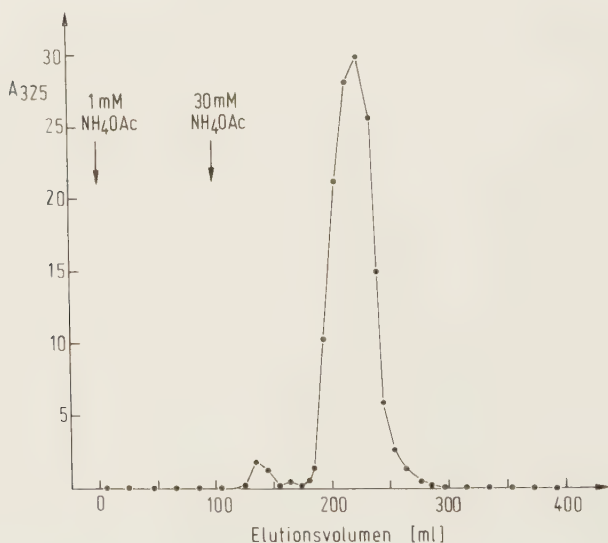


Abb. 7: Elution von Ret-P von DEAE-Sephacel (1x15 cm) in 99% MeOH mit 30 mM NH_4OAc in 99% MeOH

Extraktion:

Die von DeLuca verwendete Lyophilisation zur Entfernung von NH_4OAc führte zur teilweisen Zerstörung des labilen Ret-P, deshalb wurde eine Extraktionsmethode ausgearbeitet.

Ret-P-Lösung in 99% MeOH wurde mit 3 Vol. 60% EtOH und 2 Vol. CHCl_3 geschüttelt und die Unterphase nochmals mit 0.02 Vol. H_2O extrahiert. Am Rotavapor wurde die zweite Unterphase (nach 1:1 Verdünnung mit EtOH) auf 10–20 ml eingeeengt (20 Torr, 35°C , mit N_2 belüften), 2x mit je 5 Vol. EtOH aufgefüllt und wieder eingeeengt. Die Verluste an Ret-P während der Extraktion lagen bei 10–15%. Nach der Extraktion ließ sich kein Acetat mehr nachweisen (3.8.3).

Charakterisierung:

Spektroskopie

UV: wie originales Retinolspektrum $\lambda_{\text{max}}=325 \text{ nm}$

IR (KBr): 3400 (N-H-Streck.); 2920, 2850 (C-H-Streck.); 1650–1570 (C=C); 1450 (C=C-H-Deform.); 1395 (C-H-Deform.); 1260 (C-O); 1110, 1050, 1040, 960 (P=O und P-O) in cm^{-1} .

Dünnschichtchromatographie

Einheitlicher Fleck mit folgenden Laufeigenschaften:

LM A: $R_f=0.50$; LM B: $R_f=0.22$;

Identifikation erfolgte durch Fluoreszenz, Carr-Price-Reagenz und Sulfosalicylsäure

HPLC

Auf Reversed phase-Gradienten-HPLC (siehe 3.4.5) zeigte sich ein scharfer Peak mit kleinem Vorpeak.

Daraus errechnete sich ein cis-Anteil von 2–3%.

Stöchiometrie

Phosphatbestimmung nach Bartlett (siehe 3.8.2) ergab Retinol / Phosphat = 1.05 (basierend auf $\epsilon_{\text{Mol}(325\text{nm})}=52000$ für Retinol)

Eigenschaften:

Ret-P stellt eine sehr labile Verbindung dar, die bei $p_{\text{H}} < 5$

oder >9 schnell zerfällt. Stehenlassen einer alkoholischen Ret-P-Lösung mit $E_{325}=2.0$ bei Tageslicht für 1 h resultierte in einer vollständigen Zerstörung der UV-Absorption. In wässriger Lösung hydrolysierte Ret-P zu Anhydroretinol (Abb. 8) mit typischem 3-gipfligem Spektrum (Shantz et al., 1943), was zum Nachweis der Phosphorylierung benutzt werden kann, da Retinol unter diesen Bedingungen stabil ist.

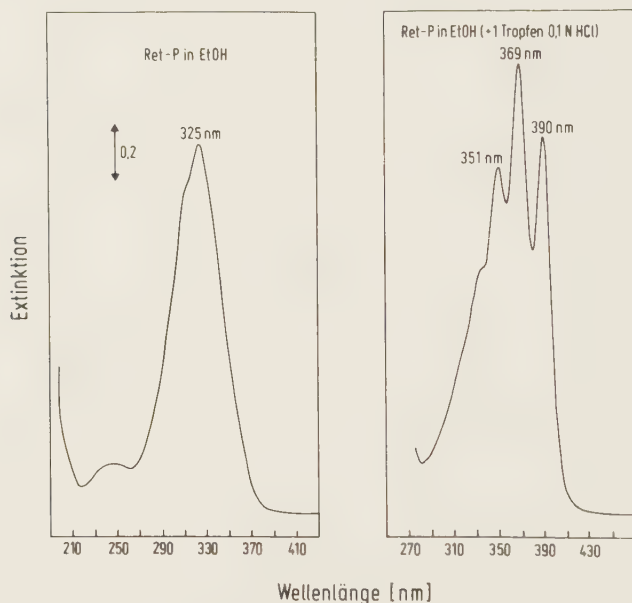


Abb. 8: UV-spektroskopischer Nachweis der Hydrolyse von Ret-P zu Anhydroretinol.

Die Halbwertszeit in CHCl_3 oder salzhaltigen Lösungsmitteln (NH_4OAc in MeOH) betrug nur 1-2 Tage. Als bestes Solvens erwies sich EtOH, in welchem Ret-P unter Argon bei -20°C aufbewahrt wurde.

3.4.2 Chemische Synthese von Ret- ^{32}P

Das ^{32}P -markierte Substrat wurde nach der in 3.4.1 beschriebenen Methode, jedoch in stark verkleinertem Ansatz hergestellt.

1 ml $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (10 mCi) wurde durch Verblasen getrocknet. Es wurde in 15 μl (59.7 μMol) einer Lösung von 1 g H_3PO_4 in 2.6 ml CH_3CN aufgenommen und mit 16.5 μl Et_3N versetzt. Nach 10 min intensivem Mischen wurde der Reaktionsmix 1 h ins Eisbad gestellt. Es bildeten sich 2 Phasen, in deren unterer kleine Kristalle zu erkennen waren, die durch Abpipettieren der Lösung isoliert und in 500 μl CH_3CN aufgenommen wurden.

Ausbeute: 4.9 mCi = 29.2 μMol BTA- ^{32}P = 49%

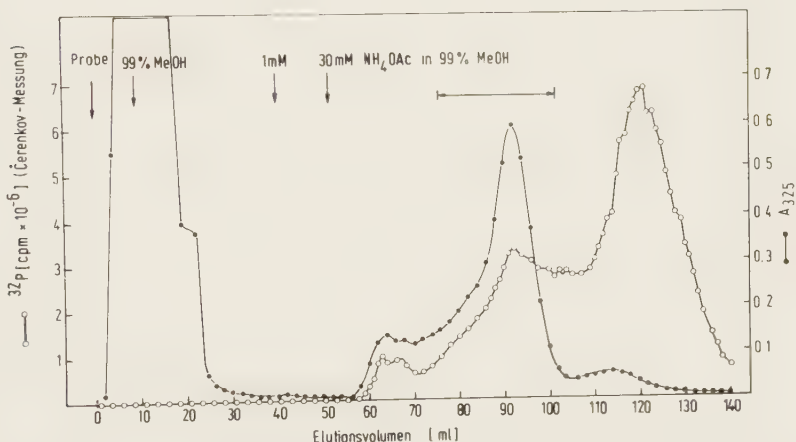


Abb. 9: Chromatographie des Ret- ^{32}P -Reaktionsgemisches an DEAE-Sephacel. Bedingungen: Probe: 10 ml Rx-Mix in 99% MeOH, waschen mit 99% MeOH, Elution mit 30 mM NH_4OAc in 99% MeOH mit 30 ml/h

In einem mit einer Serumkappe verschlossenen, kleinen Inkubationsröhrchen wurden 175 μ l BTA³²P (11.5 μ Mol) in CH₃CN und 22 μ l CCl₃CN vorgelegt und über 2 Injektionsnadeln mit Ar gespült. Mit einer Spritze wurden zur gerührten Lösung langsam 217 μ l (3.2 Mol) Retinol in CH₃CN (10mg/2.5 ml) zugegeben. Nach 1 h Rühren im Eisbad und Zusatz von 2.3 μ l halbkonz. NH₃ wurde wie üblich zentrifugiert, das Pellet nochmals mit 150 μ l 99% MeOH gewaschen und auf 10 ml 99% MeOH aufgefüllt.

Reinigung erfolgte wieder über eine DEAE-Sephacelsäule mit 3 ml Volumen. Abb. 9 zeigt das Elutionsprofil dieses Chromatographieschrittes.

Auf DC-Platten in LM C erhielt man eine fluoreszierende, radioaktive Bande mit $R_f=0.40$, neben relativ großen Mengen an Ausgangsmaterial und Verunreinigungen. Eine Extraktion nach 3.4.1. lieferte Ret-³²P, das auf dem DC-Chromatogramm nur noch eine Bande mit $R_f=0.39$ hatte (Abb. 10). Das UV-Spektrum nach Extraktion zeigte eine typische Retinolabsorption mit $\lambda_{\text{Max}}=325$ nm.

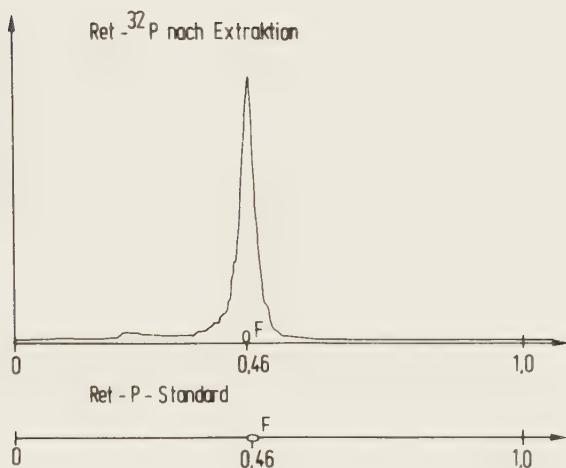


Abb. 10: Dünnschichtchromatogramm von Ret-³²P nach Extraktion. Obere Spur: 67 000 cpm Ret-³²P. Radioaktivitäts-scan. Untere Spur: 30 nMol Standard-Ret-P. Bedingungen: Si 60-Platte, LM C. F=Fluoreszenz bei 366 nm.

3.4.3 Chemische Synthese von Dol-³²P

Dol-³²P wurde ähnlich wie Ret-³²P (3.4.2.) synthetisiert, mit 124 μ l (3.6 μ Mol) Dolichol in CH₃CN, 12.6 μ l CCl₃CN und 100 μ l (11.9 μ Mol) BTA³²P in CH₃CN. Reinigung erfolgte ohne DEAE-Säule durch differentielle Extraktion. Dazu wurde der Reaktionsmix mit 1.5 ml 0.01 N NH₃-Lösung versetzt und 3x mit Et₂O, sowie 4x mit C/M 2:1 (je 1.5 ml) extrahiert. Dol-³²P zeigte auf DC-Platten einen Hauptpeak mit R_f=0.73 in LM C und geringen Verunreinigungen am Startfleck.

3.4.4 Enzymatische Synthese von Ret-P-(^{14}C)-Man

Zur halbpräparativen Herstellung von ^{14}C -markiertem Ret-P-Man wurde eine 10-fach Standardinkubation mit 6 mg BSA/ml angesetzt:

300 nMol	Ret-P in EtOH (EtOH im N_2 -Strom verblasen)
200 μl	Mikrosomen (ca.6 mg) in Puffer A
300 μl	BSA (20 mg/ml)
100 μl	300 mM MES-Puffer p_H 7.0
100 μl	50 mM MnCl_2
100 μl	25 mM ATP
100 μl	Phosphatase-Inhib.-Mix (7 mM KF, 5 mM AMP, 5 mM K-PO_4 p_H 7.6)
100 μl	GDP-Mannose (1.0 μCi)

Es wurde 10 min bei 37°C inkubiert , mit 20 ml C/M 2:1 gestoppt, zentrifugiert und der Überstand auf eine in 99% MeOH äquilibrierte DEAE-Sephacelsäule (1x15 cm) gepumpt (30 ml/h). Nach Waschen mit 100 ml 99% MeOH wurde mit 10 mM NH_4OAc in 99% MeOH eluiert und die restliche Radioaktivität mit 1 M NH_4OAc von der Säule gespült (Abb. 11).

Ausbeute: $1.1\text{--}1.2 \times 10^6$ cpm = 50-60% der GDP-Mannose

NH_4OAc wurde wie in 3.4.1 durch Extraktion entfernt.

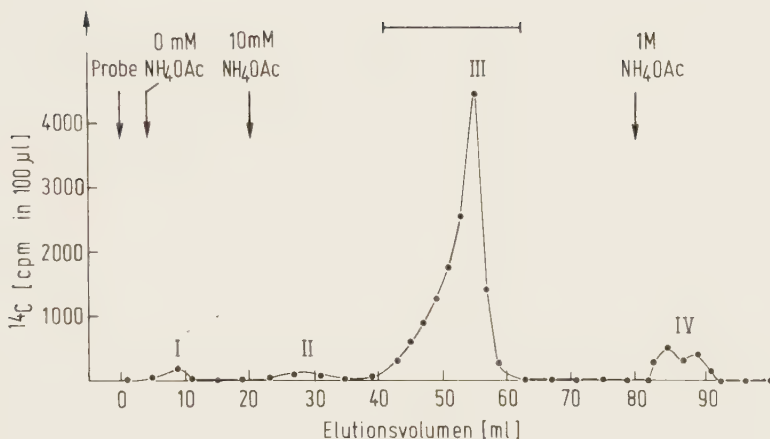


Abb. 11: Elution eines Ret-P-(^{14}C)-Man-Ansatzes von DEAE-Sephacel (1x15 cm) in 99% MeOH. Bedingungen: Pumpe 30 ml/h, Fraktionen von 5 ml. Peaks I, II und IV wurden dünnschichtchrom. als Man (I), Dol-P-Man (II) und GDP-Man + Man-P (IV) identifiziert.

Charakterisierung:

UV-Spektrum

Peak III der Elution von DEAE-Sephacel zeigte das typische Retinolspektrum mit $\lambda_{\text{Max}} = 325 \text{ nm}$. Eine Lösung von 273 000 cpm Ret-P-(^{14}C)Man in 1 ml EtOH hatte $E_{325} = 0.033$. Unter Einrechnung der spezifischen Aktivität und einem $\epsilon_{\text{Mol}} = 52\,000$ wurde eine Extinktion von 0.029 bei 325 nm erwartet.

Dünnschichtchromatographie

Gipfel III nach DEAE-Sephacel und Salzextraktion zeigte sich auf DC-Platten als einheitlicher radioaktiver Peak, mit geringen Verunreinigungen von 5%-10% am Start (siehe Abb. 12).

LM A: $R_f = 0.70-0.75$

LM B: $R_f = 0.25$

LM C: $R_f = 0.40$

Die R_f -Werte für LM B und LM C entsprachen exakt den Literaturdaten für Ret-P-Man (Masushige et al., 1978). Für LM A existieren keine Vergleichswerte.

Hydrolyse

Milde alkalische Hydrolyse (siehe 3.7.7) der Substanz des Gipfel III von Abb. 11 lieferte folgende Befunde: In der wäßrigen oberen Phase wurde ausschließlich (^{14}C)Mannosephosphat ($R_f=0.05-0.15$); jedoch keine Mannose ($R_f=0.55$) gefunden. Die untere Phase ergab nur einen Fleck mit $R_f = 0.81$, der nach Literaturdaten (Frot-Coutaz et al., 1976) und Vergleich mit den Laufeigenschaften einer Standardlösung als Anhydroretinol identifiziert wurde.

Die annähernd quantitative Spaltung zu Man-P und Anhydroretinol belegt die vermutete Ret-P-Man-Struktur.

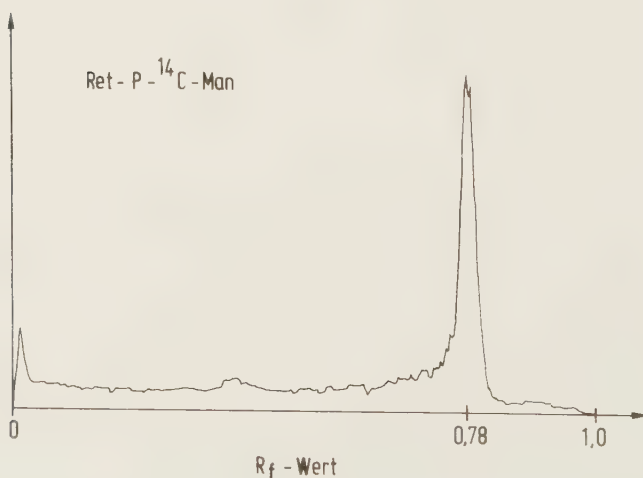


Abb. 12: DC-Scan von Ret-P-(^{14}C)Man nach DEAE-Sephacel.

Probe: 22 000 cpm Ret-P-(^{14}C)Man + 30 nMol Ret-P;
Bedingungen: Si 60-Platte, LM A.

Stöchiometrie

Sowohl aus dem UV-Spektrum und den Hydrolyseexperimenten, als auch aus Doppelmarkierungsversuchen mit Ret- ^{32}P und GDP-(^{14}C)Man (4.1.6) kann auf eine 1:1 Stöchiometrie und somit auf die Struktur Ret-P-Man geschlossen werden.

3.4.5 Photochemische Erzeugung und Abtrennung von cis-Ret-P

a) Belichtung

all-trans Ret-P (0.38 mM in EtOH) wurde in einer Quarzküvette mit einer 900 W - Kinolampe (Xenosol 23-21; Zeiss, Oberkochen) belichtet. Die Probe befand sich in einem Abstand von 90 cm von der Lichtquelle, deren Strahl mit zwei Linsen auf eine Fläche von ca. 2 cm² fokussiert wurde. Die Probe wurde im Wasserbad gekühlt und nur maximal 30 sec. ununterbrochen belichtet. Für längere Belichtungszeiten wurde nach je 30 sec. für 1 min. gekühlt.

b) cis/trans-Trennung

Zur Trennung von cis- und trans-Ret-P wurde, wegen der guten Erfahrungen beim Ret-P-Man-Test (siehe 3.5.1), Reversed phase-HPLC eingesetzt. Beide Substanzen tragen jedoch Ladungen, die zur Peakverbreiterung und damit zu schlechterer Auflösung auf Reversed phase-Säulen führen. Es erschien deswegen sinnvoll, diese nach dem Prinzip der Ionenpaar-Chromatographie mit großen Gegenionen abzusättigen, wozu 5 mM Tetrabutylammoniumphosphat (PIC A; Waters Ass., Milford, USA) verwendet wurde. Befriedigende Ergebnisse wurden aber erst nach Verdopplung der Trennstrecke auf 50 cm durch Zusammenschrauben zweier RP-Säulen mit extrem niedrigen Totvolumina (Shandon ODS, 5 µm; Bischoff, Stuttgart) erzielt.

Es wurden 25 µl ethanolische Ret-P-Lösungen injiziert und mit 50% MeOH/PIC A bei einem Fluß von 1.1 ml/min eluiert

(Pumpe Modell 300B; Gynkotheke, München). Ein angeschlossener Gradientenmischer (Modell 250; Gynkotheke, München) lieferte folgendes Gradientenprogramm:

5 min 50% MeOH/PIC A, in 30 min von 50% auf 80% MeOH/PIC A, 10 min 80% MeOH/PIC A, in 5 min von 80% auf 50% MeOH/PIC A.

Die cis-Verbindung eluierte unter diesen Bedingungen nach 48.3 min (trans-Ret-P nach 49.8 min) und wurde bei 325 nm mit einer Empfindlichkeit von 0.32 bzw. 0.16 detektiert (Monitor 2125; LKB, Bromma, Schweden).

3.5 Testsysteme

3.5.1 Test für GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferasen

a) Inkubationen

Alle Schritte an denen Ret-P oder Ret-P-Man beteiligt waren, wurden unter Rotlicht durchgeführt.

Standardinkubationen für die Ret-P-Man-Synthese enthielten in 100 μ l Gesamtvolumen:

10 μ g (30 nMol) Ret-P mit N_2 vom Lösungsmittel befreit, 50 μ l Protein, 30 mM MES p_H 7.0, 5 mM $MnCl_2$, 2.5 mM ATP, 5 mM AMP, 7 mM KF, 5 mM $K-PO_4$ -Puffer p_H 7.6, 0.05 μ Ci oder 0.1 μ Ci GDP-(^{14}C)Man (1.86 bzw. 2.69 μ M)

Dol-P-Man-Inkubationen enthielten abweichend davon:

5 μ g Dol-P mit N_2 vom Lösungsmittel befreit, 10 μ l 5% Triton X-100, 40 μ l Protein.

Es wurde in der Regel 5 min bei 37 °C inkubiert.

b) Folch-Extraktion

Die Extraktion nach Folch beruht auf einer Verteilung im ternären Lösungsmittelgemisch Chloroform/Methanol/Wasser und wurde ursprünglich zur Gesamtlipid-Extraktion aus Geweben entwickelt (Folch et al., 1957). Diese wurde zur Extraktion von Lipid-P-Zuckern wie folgt abgewandelt (De Luca et al., 1976):

Die wässrige Inkubationsmischung (100 μ l) wurde mit 1.5 ml C/M 2:1 versetzt und 1 min intensiv gemischt. Nach Zugabe von 0.4 ml H₂O wurde wiederum gemixt und die Phasen durch niedrigtourige Zentrifugation (4 500 rpm, 1 °C, 5 min) getrennt. Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und Reste durch dreimaliges vorsichtiges Überschichten der Unterphase mit ca. 0.5 ml reiner Oberphase gewegewaschen. Ein Aliquot der Unterphase (Gesamtvol. 1.0 ml) wurde in einem Szintillationsgläschen getrocknet und die Radioaktivität nach Zugabe von 3 ml Rotiszint 22 (Roth, Karlsruhe) bestimmt.

Diese modifizierte Folch-Extraktion eignete sich sehr gut für Tests der Dol-P-Man-Synthase, da gebildetes Dol-P-Man quantitativ in der unteren Phase zu finden ist, während GDP-Mannose umgekehrt nur in der Oberphase nachweisbar war. Große Probleme ergaben sich jedoch für die Tests der Ret-P-Man-Synthase. Erstens erhielt man für das polarere Ret-P-Man eine Verteilung zwischen beiden Phasen mit stark schwankender Zusammensetzung. Zweitens mußte das, zu einem erheblichen Anteil aus endogenem Dol-P entstandene, Dol-P-Man mit Dünnschichtchromatographie abgetrennt werden. Die Dünnschichtchromatographie ist jedoch eine besonders für Reihenversuche sehr zeitraubende Methode, die im Falle von Ret-P-Man den zusätzlichen Nachteil hat, daß Luftsauerstoff sehr sorgfältig ausgeschlossen werden muß, da Ret-P-Man ansonsten auf der DC-Platte zerstört wird. Trotz dieser Probleme liegt die Folch-Extraktion allen verfügbaren Literaturdaten zu Grunde.

c) Reversed phase-HPLC

Aus den oben genannten Gründen wurde ein neues Testsystem entwickelt, das auf der Trennung der interessierenden Substanzen mit HPLC auf einer Reversed phase-Säule beruht.

Die Inkubation wurde durch Zugabe von 2 ml eiskaltem C/M 2:1 zur Inkubationsmischung gestoppt. Es wurde ca. 30 sec. gemixt und ausgefälltes Protein 5 min bei 4 500 rpm und 1 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst quantitativ in einen 5 ml Spitzkolben übergeführt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen (20 °C, 20 Torr, N₂-Belüftung). Der Rückstand wurde in 150 µl 99% MeOH aufgenommen und ein Aliquot von 100 µl auf die HPLC-Säule (Shandon ODS, 5 µm) injiziert. Elution erfolgte isokratisch mit 20% n-Propanol bei einer Flußrate von 1.0 ml/min (Pumpe Modell 200; Gynkotheke, München). Der Verlauf der Radioaktivität wurde mit einem Radioaktivitätsmonitor (LB 503; Berthold, Wildbad) verfolgt und Fraktionen zu 1 min aufgefangen, die mit 9 ml Rotiszint 22 im Szintillationszähler ausgezählt wurden.

Abb. 13 zeigt einen typischen HPLC-Lauf nach Ret-P/Dol-P-Inkubation. Im Ausschlußvolumen der RP-Säule (3.9 min) wurden GDP-Mannose und Hydrolyseprodukte eluiert, während Ret-P-Man mit einer Retentionszeit 10-11 min eluiert wurde. Dol-P-Man verblieb unter diesen Bedingungen auf der Säule, so daß Routine-Ret-P-Man-Tests nur maximal 20 min beanspruchten. Dol-P-Man konnte durch Wechsel des Elutionsmittels auf 100% n-Propanol von der Säule gespült werden. Dies gab die Möglichkeit Ret-P-Man und Dol-P-Man im gleichen Inkubationsansatz nebeneinander zu bestimmen. HPLC-Methode und Folch-Extraktion erbrachten für Dol-P-Man innerhalb der Fehlergrenzen identische Ergebnisse.

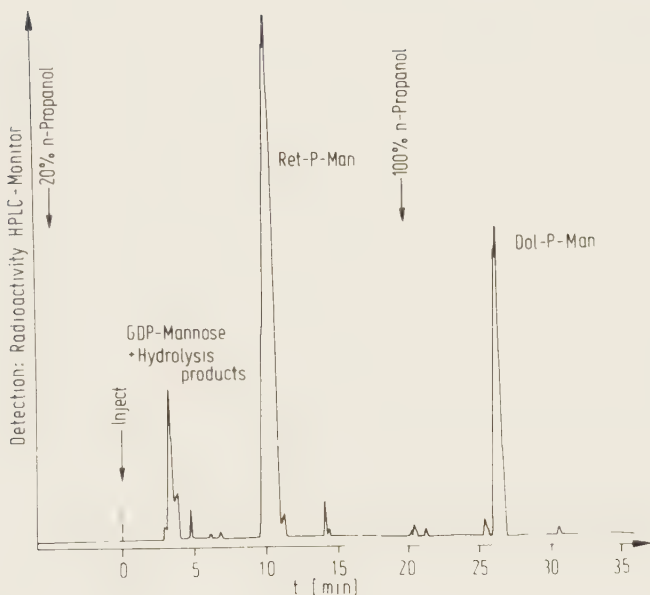


Abb. 13: HPLC-Auftrennung nach Ret-P/Dol-P-Inkubation auf einer Reversed phase-Säule. Inkubationen waren mit 20 μ l mikrosomaler Fraktion, 10 μ g Ret-P und 2.5 μ g Dol-P, ansonsten Standardbedingungen. HPLC: 1 ml/min 20% n-Propanol für 20 min, dann 100% n-Propanol; Detektorempfindlichkeit 300 cpm.

Versuche mit säulenchromatographisch gereinigtem Ret-P-(^{14}C)Man und Dol-P-(^{14}C)Man zeigten, daß über 90% des Ret-P-Man und 95% des Dol-P-Man im Eluat nach HPLC wiedergefunden werden konnte. HPLC-Läufe auf polaren Si 60-Säulen ergaben dagegen für Ret-P-Man Wiederfindungsraten von <60%, was wiederum auf die Empfindlichkeit dieser Substanz hinweist (siehe auch Verhalten auf DC-Platten). Die Identifizierung von Ret-P-Man wurde bereits in 3.4.4 beschrieben.

3.5.2 Test des Mannosetransfers auf endogene Akzeptoren

Dieser Test beruht auf der differentiellen Extraktion aller nicht proteingebundener Radioaktivität nach Inkubation einer Proteinfraction mit einem (^{14}C)Mannosedonor.

Standardinkubationen enthielten in 50 μl Gesamtvolumen:

30 000 cpm Ret-P-(^{14}C)Man mit N_2 vom Lösungsmittel befreit, 30 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5% Triton X-100, 5mM MnCl_2 und 20 μl Protein.

Es wurde 30 min bei 27 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskaltem C/M 2:1 gestoppt. Nach Zentrifugation bei 9 800 xg für 1 min wurde der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde 6x mit je 1 ml C/M 2:1, 7x mit je 1 ml H_2O und 3x mit je 1 ml C/M/H 10:10:3 gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde 1 min gemixt und anschließend 1 min zentrifugiert. Das resultierende Proteinpellet wurde mit 100 μl Extraktionspuffer (10% SDS, 8 M Harnstoff, 2.5% Mercaptoethanol in 10 mM Tris-HCl pH 7.5) für 10 min bei 95 $^{\circ}\text{C}$ behandelt.

Der Überstand nach SDS-Extraktion enthielt mehr als 90% der eingebauten Gesamtradioaktivität. Das noch verbliebene Pellet wurde in 0.1 N NaOH bei 56 $^{\circ}\text{C}$ gelöst (ungefähr 30 min).

3.6 Chromatographische Methoden

3.6.1 Papierchromatographie

Absteigende Papierchromatographie wurde auf Whatman-Papier No.1 (25x45 cm) durchgeführt.

Laufmittel waren:

LM A:	EtOH/1 M NH_4OAc pH 5.0	7:3
LM B:	i-Propanol/15 N $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$	7:1:2

3.6.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden fertige Si 60-Kieselgelplatten (Nr. 5553; Merck, Darmstadt) ohne Fluoreszenzindikator verwendet.

Laufmittel waren:

LM A:	C/M/H	45:35:6
LM B:	C/M/H	60:25:4
LM C:	C/M/H	60:35:6
LM D:	Toluol/C/M	50:12:12

Für DC-Untersuchungen an Ret-P oder Ret-P-Man wurde der DC-Tank intensiv mit Argon gespült und die Probe unter Argonatmosphäre aufgetragen. Radioaktiven Substanzen wurde in der Regel als zusätzlicher Schutz 10 μg kaltes Ret-P zugesetzt. Die Detektion der Substanzflecke erfolgte mit Fluoreszenz bei 366 nm, Carr-Price-Reagenz (gesättigte Lösung von SbCl_3 in CHCl_3) oder Sulfosalicylsäure (7 g Sulfosalicylsäure, 0.1 g $\text{FeCl}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ in 100 ml 75% EtOH). Carr-Price-Reagenz wirkt spezifisch auf konjugierte Doppelbindungssysteme und zeigt mit Retinol eine charakteristische Blaufärbung. Sulfosalicylsäure ist ein Nachweisreagenz auf Phosphatester und zeigt weiße Flecken auf violetterm Hintergrund. Radioaktive Substanzen wurden mit einem DC-Radioscanner lokalisiert (LB 2723; Berthold, Wildbad).

3.6.3 Gelfiltration an AcA 34

Eine Ultrogel AcA 34-Säule (LKB, Bromma, Schweden) mit den Dimensionen 1.6 x 50 cm wurde in Puffer D äquilibriert (40 ml/h). Es wurden 1-2 ml ÜS 2% Brij 58 (17-34 mg Protein) aufgetragen und bei 20 ml/h mit Puffer D eluiert. Fraktionen

von 10 min wurden gesammelt und die Aktivitäten von Ret-P-Man/Dol-P-Man-Synthase im Standardtest analysiert (50 μ l Eluat, 0.1 μ Ci GDP-Man).

3.6.4 Hydroxylapatit-Chromatographie

Hydroxylapatit-Ultrogel (LKB, Bromma, Schweden) wurde nach der Firmenvorschrift vorbehandelt. Eine Säule mit 2.6 x 5 cm wurde mit Puffer B bei einer Pumpgeschwindigkeit von 45 ml/h äquilibriert. 2 ml (35 mg Protein) des Solubilisierungsüberstandes nach 2% Brij 58 in Puffer A wurden 1:10 mit Puffer B verdünnt und mit 30 ml/h auf die Säule gepumpt. Nach 60 ml (20 Fraktionen) wurde ein linearer Gradient von 5 bis 500 mM $K-PO_4$ pH 7.6 (je 50 ml) angelegt. Die einzelnen Fraktionen wurden wie in 3.6.3 auf Ret-P-Man/Dol-P-Man-Aktivität getestet und der Proteingehalt nach der Amidoschwarzmethode bestimmt.

3.6.5 Chromatographie an DEAE-Sephacel

Ionenaustauscher-Chromatographie wurde an DEAE-Sephacel (2.6 x 8 cm) in Puffer C durchgeführt. Dazu wurden 2 ml $\bar{U}S$ 2% Brij 58 (35 mg Protein) 1:10 mit Puffer C verdünnt und mit 30 ml/h auf die Säule aufgetragen. Es wurde mit 100 ml Startpuffer (Puffer C) gewaschen und anschließend mit einem linearen Gradienten von 0 bis 500 mM KCl in Puffer C (je 100 ml) eluiert. In jeder zweiten Fraktion (10 min) wurden wie üblich die Lipid-P-Man-Syntheseaktivität und der Proteingehalt bestimmt.

3.7 Allgemeine Methoden

3.7.1 Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden mit Gradientengelen (9% bis 24%, Oberel 3%) nach der Lämmli-Methode durchgeführt (Lämmli, 1970). Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer (3.4% SDS, 150 mM Tris-HCl p_H 6.8, 42% Glycerin 1% Mercaptoethanol und 0.004% Bromphenolblau) verdünnt und 3 min bei 100 °C gekocht. Es wurde über Nacht bei konstanter Spannung von 135 V (15 mA) elektrophoretisiert. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie G 250 (Serva, Heidelberg).

Für nichtdenaturierende PAGE wurden 15% Trenngele und 3% Obergele verwendet, mit 1% Triton X-100 statt SDS im Gel, Elektrodenpuffer und Probenpuffer. Außerdem erwies es sich als wichtig für eine gute Auflösung, bei möglichst geringer Ionenstärke zu arbeiten. Die Proteinproben wurden deshalb in 10 mM statt 50 mM Trispuffer solubilisiert und die Triskonzentration im Probenpuffer von 150 mM auf 10 mM reduziert.

3.7.2 Elektroelution

Coomassie-gefärbte Banden wurden mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten, entfärbt und fein zerstückelt. Ein Glasröhrchen einer Disk-Gelapparatur wurde mit Gelstückchen gefüllt und diese in 3% Polyacrylamidlösung einpolymerisiert. An einem Ende wurde ein Hohlraum von ca. 0.5 cm Höhe ausgekratzt, mit 50 mM Tris-HCl p_H 8.0 / 1% SDS gefüllt und mit einer Dialysemembran verschlossen. Es wurde anschließend für 3 h bei 200 V/15 mA elektroeluiert. Zur Konzentrierung wurde der Puffer, der das gelöste Protein enthielt, mit 1 Vol. 20% TCA versetzt und der Niederschlag in wenig SDS-Probenpuffer gekocht.

3.7.3 Solubilisierung

Mikrosomale Membranfraktion in Puffer A, mit einer Proteinkonzentration von 25-30 mg/ml wurde mit 1/10 Vol. konzentrierter Detergensiösung (5%-20%) versetzt und intensiv gemixt. Nach 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln wurde 1 h bei 125 000 xg und 1 °C in einem 70.1 Ti-Rotor (Beckman, Palo Alto, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und als solubilisierter Enzymfraktion eingesetzt.

3.7.4 Differentielle Polyethylenglykoll-Fällung

Eine in 2% Brij 58/Puffer A solubilisierter Membranfraktion mit ca. 8 mg/ml Protein wurde mit einer Lösung von 25% Polyethylenglykoll (PEG) 6000 in Puffer A auf eine definierte PEG-Konzentration gebracht. Nach 30 min auf Eis wurde das Präzipitat bei 70 000 xg für 1 h bei 1 °C abzentrifugiert und in Puffer A resuspendiert. Der Überstand wurde wieder mit der 25%igen PEG-Lösung versetzt und die nächst höhere Konzentration an PEG eingestellt (normalerweise 1%-Abstände). Sämtliche Präzipitate einer solchen differentiellen Fällungsreihe wurden mit den Standardtests sowohl auf Ret-P-Man- als auch auf Dol-P-Man-Syntheseaktivität geprüft. Für Experimente in Niedrigsalz wurde die Konzentration aller Bestandteile des Puffers A (Gesamt: 75 mM Salz) auf 1/5 herabgesetzt, für die Hochsalzbedingungen um das 5-fache erhöht, ansonsten jedoch analog der oben beschriebenen Methode verfahren.

3.7.5 Lipidextraktion

Die Gesamtlipidextraktion mikrosomaler Rattenlebermembranen wurde nach der Methode von Folch et al. (1957) mit leichten Modifikationen durchgeführt. Dazu wurden 0.5 ml Membransuspension in Puffer A mit 10 ml C/M 2:1 versetzt und intensiv gemischt. Nach Zentrifugation (10 min, 4 500 rpm) wurde der Überstand abpipettiert und das verbliebene Pellet noch 2x mit 10 ml C/M 2:1 extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden mit 0.2 Volumenteilen 0.9% NaCl in H₂O intensiv geschüttelt und die Phasen durch niedrigtourige Zentrifugation getrennt. Die Unterphase wurde noch 2x mit der Oberphase aus den reinen Lösungsmitteln überschichtet und wieder abpipettiert. Mit MeOH wurde auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Eine Phosphatbestimmung nach Bartlett ergab einen Wert von 0.8 $\mu\text{Mol P}_i/\text{mq Protein}$.

3.7.6 Herstellung von Phospholipidvesikeln

Phospholipidvesikel wurden nach der Beschallungsmethode gewonnen. Dazu wurde in C/M 2:1 gelöstes Phospholipid in einem Dounce-Homogenisator (15 ml) im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit und mit 10 mM HEPES p_H 7.0 eine Konzentration von ca. 25 mg/ml eingestellt. Nach intensivem Homogenisieren wurde im Eisbad beschallt (Sonifier B 15, Branson, Heusenstamm) bis die Lösungen klar waren (15-30 min). Anschließend wurde noch 1.5 h bei 80 000 xg zentrifugiert. Die so erhaltenen Vesikel sind relativ homogen und haben eine Durchschnittsgröße von ca. 200 Å (Hegemann, 1984).

3.7.7 Hydrolyse von Ret-P-Man

Zur Identifizierung wurde Ret-P-Man nach DEAE-Sephacel einer milden alkalischen Hydrolyse unterworfen. 20 000 cpm Ret-P-(^{14}C)Man in 300 μl 99% MeOH wurden mit 30 μl 1N NaOH versetzt und 20 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Neutralisation mit 30 μl Essigsäure wurden 350 μl CHCl_3 und 100 μl H_2O zupipettiert und intensiv geschüttelt. Phasentrennung wurde durch niedrigtourige Zentrifugation (4 500 rpm, 5 min, 1 $^{\circ}\text{C}$) erreicht. Die obere Phase wurde mit Papierchromatographie in LM B untersucht. Die untere organische Phase wurde konzentriert und mit DC in LM D analysiert (Carr-Price-Reagenz).

3.7.8 Hydrolyse von O-glycosidischen Oligosacchariden

O-glycosidisch gebundene Oligosaccharide wurden nach Literaturangaben (Spiro, 1972) durch β -Elimination vom Proteinteil abgespalten und als Überstand nach TCA-Fällung von den intakten N-glycosidischen Kohlenhydratketten, die sich im Pellet befinden, abgetrennt.

Dazu wurden 5 000 - 10 000 cpm (^{14}C)Mannose-markiertes Protein, das durch Inkubation mit Ret-P-(^{14}C)Man gewonnen wurde, 1:10 mit 0.1 N NaOH verdünnt und bei 37 $^{\circ}\text{C}$ für 48 h inkubiert. Die Hydrolyse wurde mit dem gleichen Volumen 20% TCA gestoppt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 500 rpm wurde die Radioaktivität in Überstand und Pellet bestimmt.

3.8 Analytische Methoden

3.8.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung mit Amidoschwarz (Neuhoff et al., 1979) erwies sich als die einzig brauchbare Methode für Detergenslösungen, besonders bei geringen Proteinkonzentrationen. Statt den gefärbten Proteinfleck aus dem Celluloseacetat zu waschen, wurde dieser jedoch, wegen der besseren Reproduzierbarkeit, mitsamt dem Celluloseacetat in 1 ml einer Mischung von 50 g TCA, 400 ml Essigsäure, 25 ml Ameisensäure und 100 ml H_2O aufgelöst. Die Absorption dieser Lösung wurde bei 630 nm abgelesen und Eichkurven mit BSA als Standard aufgenommen.

3.8.2 Phosphatbestimmung

Phosphat wurde im wesentlichen nach der Methode von Bartlett (1959), allerdings mit anderen Reagentienmengen, analysiert. Lipid-Phosphatproben wurden in einem 0.9×10 cm Reagenzglas unter N_2 vom Lösungsmittel befreit und mit 200 μ l 70% $HClO_4$ bei 200 °C für 20 min refluxiert. Dabei wurden die Rggl. auf einer Heizplatte in einem Winkel von 45° fixiert, um Verdampfungsverluste zu verkleinern. Nach Abkühlen wurde mit 1 ml Ammoniummolybdat-Lösung und 1 ml Reduktionslösung versetzt und 10 min im Wasserbad bei 100 °C gekocht. Die Absorption wurde bei 820 nm bestimmt und KH_2PO_4 als Standard verwendet.

3.8.3 Enzymatische Tests

Phosphatase-Aktivität mit 4-Nitrophenyl-phosphat als Substrat wurde nach Walter & Schütt (1974) analysiert.

Die Aktivitäten von Phosphodiesterase (Razzell, 1963), Mannose-6-phosphatase (Arion et al., 1976) und Dinucleotid-phosphatase (Brandan & Fleischer, 1982) wurden ohne Änderungen nach den angegebenen Literaturmethoden bestimmt. Ebenso erfolgte die enzymatische Analyse von Acetat direkt wie beschrieben (Holz & Bergmeyer, 1974).

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase

4.1.1 Optimierung der Testbedingungen

In der Literatur wurden folgende Inkubationsbedingungen für die Synthese von Retinyl-phospho-mannose (Ret-P-Man) mit Rattenlebermikrosomen beschrieben (Sasak & DeLuca, 1980):

10 μ g (30 nmol) Retinylphosphat (Ret-P), Lösungsmittel verblasen; dazu im Gesamtvolumen von 100 μ l: 50 μ l mikrosomale Fraktion (MF) in Puffer A, 0,5% TX-100, 30 mM Tris-HCl p_H 8,0, 3mM ATP, 10 mM $MnCl_2$, 0,1 μ Ci GDP-Man (0,37 nMol); Inkubation 30 min bei 37 °C.

Im neuentwickelten HPLC-Test (siehe 3.5.1) wurde damit eine Aktivität von 5898 ± 268 cpm Ret-P-Man/mg Protein gemessen. Diese Syntheserate erschien, verglichen mit anderen bekannten Glycosyltransferasen (Beyer et al., 1982) sehr niedrig, zumal sogar Ret-P-Inkubationen mit partiell gereinigter Dol-P-Man-Synthase aus Hefe (freundlicherweise von Prof. W.Tanner, Universität Regensburg zur Verfügung gestellt) unter Bedingungen aus dem Labor Tanner wesentlich höhere Ret-P-Man-Syntheseaktivitäten erbrachte. Aus diesem Grund wurden verschiedene Versuche zur Optimierung der Inkubationsbedingungen unternommen.

a) Phosphatasen/Phosphodiesterasen

Ein relativ großer Anteil der Radioaktivität im HPLC-Test tauchte im Ausschlußvolumen der Säule auf und wurde als

Hydrolyseprodukte identifiziert. Tests auf die Aktivität von Phosphatasen und Phosphodiesterasen unter den oben beschriebenen Ret-P-Man-Inkubationsbedingungen zeigten folgende Ergebnisse:

Tab. 2: Aktivität von Phosphatasen/Phosphodiesterasen in MF (Durchführung siehe 3.8.3)

Substrat	Aktivität	
	Bedingungen	(nmolxmg ⁻¹ xmin ⁻¹)
4-Nitrophenylphosphat	Inkub.mix p _H 7.6; 37 °C	30.7
bis-4-Nitrophenylphosphat	dto.	7.3

Inkubationen mit GDP-Mannose ohne Ret-P und papierchromatographische Analyse der Produkte zeigte außerdem, daß unter diesen Bedingungen 25% der GDP-(¹⁴C)Mannose zu (¹⁴C)Mannosephosphat abgebaut wurden (Abb. 14).

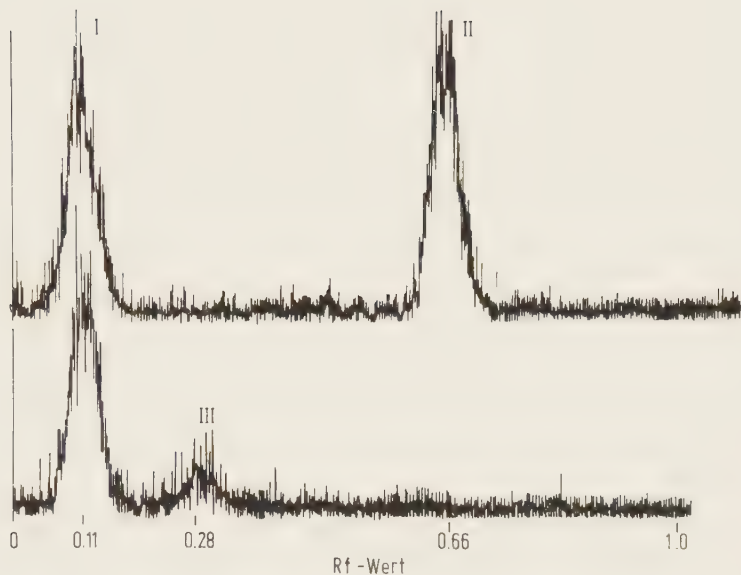


Abb. 14: Enzymatische Spaltung von GDP-(^{14}C)Man zu (^{14}C)Mannosephosphat. Radioaktivitätsscan nach Papierchromatographie in LM A (je ca. 20 000 cpm). Obere Spur (Standardsubstanzen): I = GDP-(^{14}C)Man, II = (^{14}C)Man. Untere Spur (Inkubationsmix): III = (^{14}C)Mannosephosphat.

Diese Ergebnisse legten den Schluß nahe, daß auch Ret-P und während der Inkubation gebildetes Ret-P-Man durch Phosphatasen/Phosphodiesterasen angegriffen werden. Es wurde deswegen versucht, die Ausbeute an Ret-P-Man durch den Einsatz von Phosphatase/Phosphodiesterase-Inhibitoren zu steigern. In Abb. 15 sind die Resultate für KF, AMP und Phosphatpuffer als mögliche Inhibitoren zusammengefaßt. Für die Ret-P-Man-Synthese ergab sich eine Steigerung auf 190% des Ausgangs-

wertes mit der Kombination 7mM KF/5mM AMP/5mM Phosphatpuffer p_H 7.6 ("Phosphatase-Inhibitor-Mix"). Damit verglichen, fiel

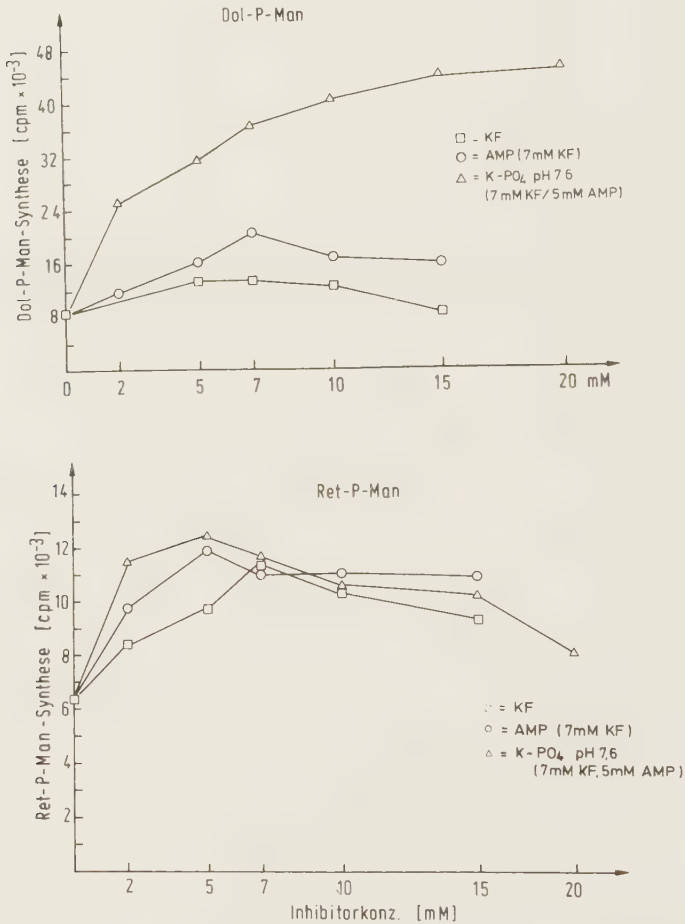


Abb. 15: Effekt von Phosphatase/Phosphodiesterase-Inhibitoren auf die Dol-P-Man-Synthese (oben) bzw. die Ret-P-Man-Synthese (unten).

bei der Dol-P-Man-Synthese nach Inkubation mit Dol-P auf, daß Phosphat einen viel größeren Effekt auf die Syntheserate hatte. Zusatz von $K-PO_4$ p_H 7.6 ohne KF/AMP brachte sogar eine fast 8-fache Steigerung der Dol-P-Man-Aktivität mit einem Maximum bei 50 mM.

b) Detergens

Aus Untersuchungen an der schon erwähnten Dol-P-Man-Synthase aus Hefe (Babczinski et al., 1980) geht hervor, daß Triton-Konzentrationen größer als 0.1% in diesem System inhibierend

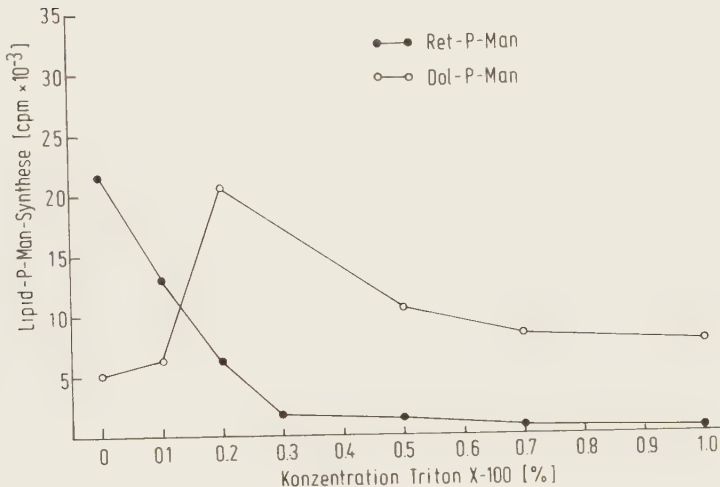


Abb. 16: Effekt von TX-100 auf Ret-P-Man/Dol-P-Man-Aktivität

wirken. Messungen der Ret-P-Man/Dol-P-Man-Synthese in Abhängigkeit von zugesetztem Triton X-100 (Abb. 16) lieferten das überraschende Ergebnis, daß die Ret-P-Man-Bildung

ohne jedes Detergens am besten funktioniert. Die Aktivität ohne Triton-Zusatz war gegenüber der Inkubation nach Sasak & DeLuca (1980) um den Faktor 15 erhöht. Im Gegensatz dazu scheint die Dol-P-Man-Synthase TX-100 zur optimalen Aktivität zu benötigen, wobei das Maximum bei 0.2-0.5% TX-100, je nach Protein-Konzentration, lag.

Für den großen Unterschied der beiden Transferaseaktivitäten könnten drei Gründe maßgeblich sein. Erstens könnte der beobachtete Effekt das reine Löslichkeitsverhalten der beiden Substrate widerspiegeln. Das kleine hydrophilere Ret-P hat wahrscheinlich eine größere Löslichkeit in einer rein wässrigen Inkubationsmischung als das stark hydrophobe Dol-P. Zweitens übertrifft die Membranaktivität des Ret-P diejenige des Dol-P, d.h. Ret-P wird sich besser in der Lipid-Doppelschicht der mikrosomalen Vesikel lösen. Unter der Voraussetzung, daß die Substratbindungsstelle der Dol-P-Man-Synthase im Innern der Vesikel lokalisiert ist (Snider et al., 1980), könnte man drittens die ansteigende Flanke der Dol-P-Man-Kurve in Abb. 16 ebenso als Erhöhung der Permeabilität der Vesikelmembran und damit als besserer Zutritt von Dol-P erklären. Im Fall von Ret-P-Man könnte das Ausbleiben der Detergensaktivierung darauf hindeuten, daß hier die aktive Stelle des Enzyms an der Außenseite der Vesikel liegt. Höhere Konzentrationen von Triton X-100 wirkten stark inhibierend auf beide Enzyme, ein Phänomen, das bei vielen Membranproteinen beobachtet wird.

c) BSA-Effekt

1981 wurde von DeLuca und Mitarbeitern berichtet, daß BSA die Aktivität der Ret-P-Man-Synthase stark steigern kann (Shidoij & DeLuca, 1981). Bei Anwesenheit von Detergens (0.5% TX-100) im Inkubationsansatz konnten diese Autoren jedoch keine BSA-Stimulierung mehr beobachten. Abb. 17 zeigt, daß BSA, bis zu einer Konzentration von 6 mg/ml, eine stimulierende Wirkung auf die Ret-P-Man-Synthase in detergensfreien Mikrosomen hatte. Unter optimalen Bedingungen

wurden dabei 65% der Mannose aus GDP-Man auf Ret-P übertragen. Im Gegensatz zum Test in TX-100 bewirkte BSA-Zusatz jedoch eine ähnliche Steigerung der Aktivität bei Inkubation mit Mikrosomen, die in 2% Brij 58 solubilisiert worden waren (siehe 4.1.2).

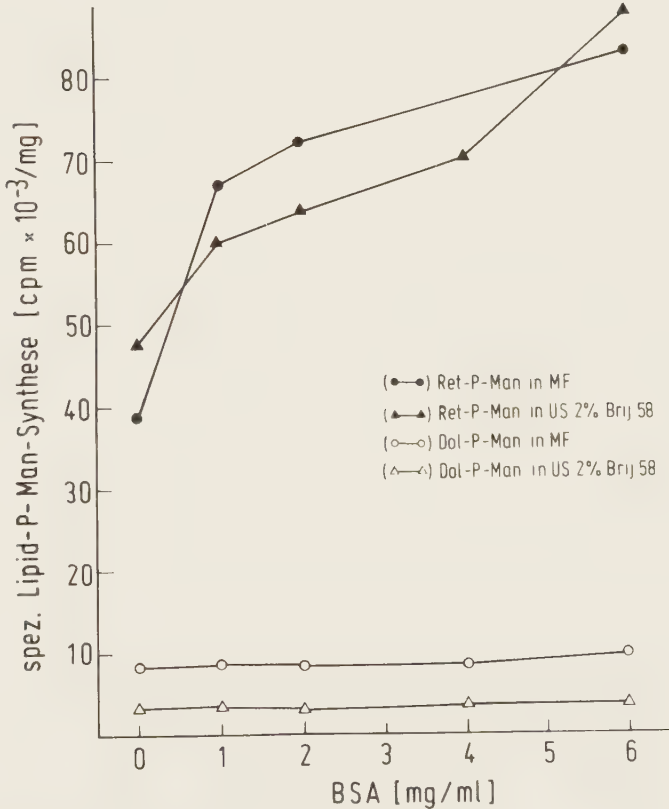


Abb. 17: Stimulierung der Ret-P-Man-Aktivität mit BSA. Standardtests mit 20 μ l MF bzw. $\ddot{U}$ S 2% Brij 58 (Dol-P-Inkubationen jedoch ohne TX-100).

Kein BSA-Effekt war für die Dol-P-Man-Synthese, sowohl mit mikrosomaler Fraktion, als auch mit dem Solubilisierungsüberstand zu erkennen.

Der Grund für die beobachtete Stimulierung liegt wahrscheinlich in der hohen Bindungsfähigkeit von BSA für lipophile Substanzen (Blaner & Churchich, 1980). BSA könnte auf diese Weise die Löslichkeit von Ret-P im Inkubationspuffer erhöhen und so dem Enzym eine höhere Substratkonzentration zugänglich machen. Die vermutete Bindung an BSA könnte außerdem das labile Ret-P vor hydrolytischer Spaltung während der Inkubation schützen.

d) Standardtest

Aus den Optimierungsversuchen ergaben sich folgende Standardinkubationen für die Ret-P-Man-Synthese:

Tab. 3 : Bedingungen des Standardtests

Substanz	-BSA	+BSA
Ret-P (LM mit N ₂ verblasen)	10 µg	10 µg
Protein	50 µl	20 µl
BSA (20mg/ml)	-	30 µl
0.3 M MES-Puffer p _H 7.0	10 µl	10 µl
25 mM ATP	10 µl	10 µl
50 mM MnCl ₂	10 µl	10 µl
70 mM KF, 50 mM AMP, 50 mM K-PO ₄ p _H 7.6	10 µl	10 µl
0.05 oder 0.1 µCi GDP-(¹⁴ C)Man (entsprechend 0.19 bzw. 0.37 nMol)	10 µl	10 µl

Abweichend davon wurden Dol-P-Man-Inkubationen mit 5 µg Dol-P, 40 µl Protein und 10 µl 5% TX-100, ansonsten aber wie

für Ret-P-Man, durchgeführt.

In der Regel wurde jeder Test als Doppelbestimmung angesetzt, und ein dritter Ansatz getestet, wenn die Abweichung zwischen beiden Werten größer als 15% betrug.

e) Einfluß der einzelnen Inkubationsbestandteile

Effekte der einzelnen Bestandteile des Standardinkubationsansatzes auf die jeweiligen Lipid-P-Man-Syntheseraten sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 4 : Einfluß der einzelnen Inkubationsbestandteile auf den Standardtest

Substanz	Ret-P-Man (cpm)	Dol-P-Man (cpm)
Komplett	26 800	45 320
- Lipid-P	151	711
- MES	18 310	41 920
- ATP	9 770	38 550
- Inhib.mix	9 360	35 360
- $MnCl_2$	166	10 120
- TX-100	--	14 956

Bedingungen: 20 μ l MF, 0.05 μ Ci;

Inhib.mix = 70 mM KF, 50 mM AMP, 50 mM

$K-PO_4$ p_H 7.6

die im Standardtest erreichten spezifischen Ret-P-Man-Aktivitäten von 89 300 cpm/mg mit 0.1 μ Ci GDP-Man lagen somit, verglichen mit den 5 900 cpm/mg aus der Literatur (Sasak & deLuca, 1980), um den Faktor 15 höher.

4.1.2 Solubilisierung

Sowohl die Ret-P-Man- als auch die Dol-P-Man-Syntheseaktivität ließen sich mit Triton X-100 fast quantitativ extrahieren. Die in diesem Detergens solubilisierten Enzyme erwiesen sich jedoch als sehr instabil (Ret-P-Man-Aktivität weniger stabil als Dol-P-Man-Aktivität). Nach einer Vielzahl von Versuchen zur Stabilisierung der Aktivitäten in TX-100, die sich alle als unfruchtbar erwiesen, wurde eine Reihe anderer Detergentien, deren Strukturen die Abb. 18 zeigt, auf ihre Verwendbarkeit geprüft. Dabei wurde die Ret-P-Man-Bildung im Überstand nach Solubilisierung in drei Detergenskonzentrationen (wo möglich 0.5, 1.0, 2.0%) getestet und der Proteingehalt des Überstandes bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt (Methode siehe 3.7.3).

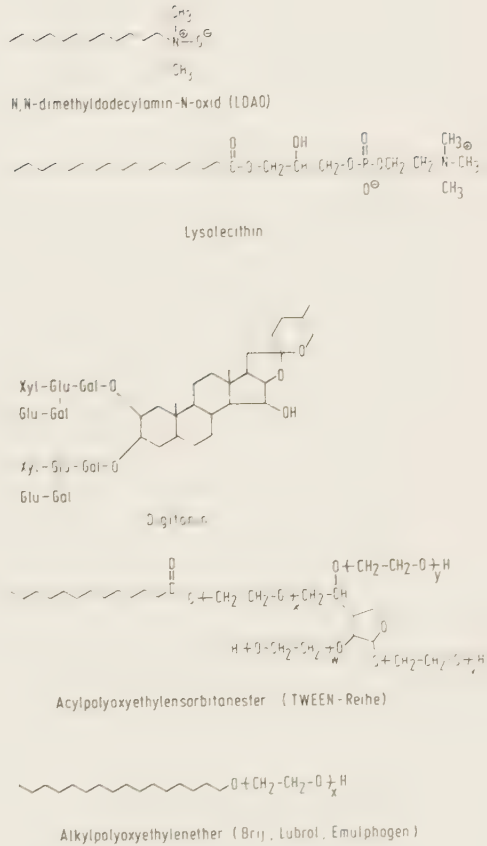
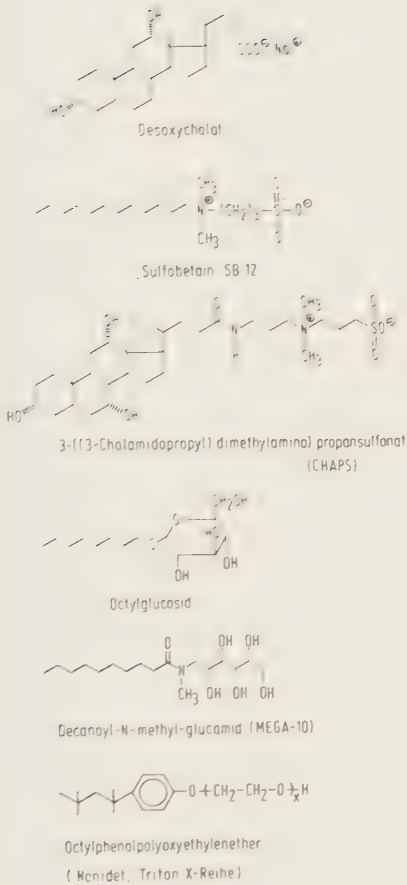


Abb. 18: Strukturen der wichtigsten Detergentien

Tab. 5: Ret-P-Man-Synthese im Überstand nach Solubilisierung
in verschiedenen Detergentien und drei Konzentrationen

Detergentien	% Protein im ÜS			Ret-P-Man im ÜS (cpm)		
Konzentration:	0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%
<u>anionisch</u>						
Desoxycholat	74	70	75	0	0	20
<u>zwitterionisch</u>						
LDAO*	28	25	58	947	297	0
Sulfobetain SB 12	40	75	80	636	110	0
Lysolecithin**	4	5	6	47	222	643
CHAPS	16	24	28	5 474	13 985	13 161
<u>nichtionisch</u>						
Digitonin***	10	13	15	207	129	50
Octylglucosid	14	29	49	1 376	2 239	0
MEGA-10	10	15	15	1 256	405	416
Tween 20	10	13	18	117	147	323
Tween 80	10	12	11	150	110	66
Triton X-100	25	41	55	8 637	15 423	6 940
Triton X-114	21	38	60	2 288	12 586	10 499
Triton X-165	23	33	32	1 677	4 976	4 953
Nonidet P 40	25	41	48	3 953	12 500	4 116
Emulphogen	23	34	51	2 480	9 390	10 920
Lubrol PX	32	42	47	9 326	13 986	12 327
Lubrol WX	14	41	42	4 044	14 955	15 798
Pluronic L 64	8	7	6	402	396	402
Pluronic F 68	6	7	8	347	158	120
Brij 35	19	27	30	6 120	8 586	8 457
Brij 56	-	36	47	--	14 292	15 905
Brij 58	18	36	35	1 117	11 119	12 119
Brij 76	11	15	14	6 426	1 993	1 546
Brij 78	15	27	30	864	4 127	7 730
Brij 96	14	30	41	1 127	8 441	12 201
Brij 98	12	19	27	839	7 873	6 846
Brij 99	9	27	31	276	4 520	6 740

Erläuterungen: * Konz.: 0.2%, 0.5% und 1.0%
 ** Konz.: 0.06%, 0.12%, 0.25%
 *** Konz.: 0.005%, 0.01% und 0.02%
 CHAPS = 3-((3-cholamidopropyl)dimethylamino)
 propansulfonat
 LDAO = N,N-dimethyldodecylamin-N-oxid
 MEGA-10 = Decanoyl-N-methyl-glucamid

Aus Tabelle 5 ist zu erkennen, daß nur nichtionische Polyoxyethylen-Detergentien (mit Ausnahme des zwitterionischen CHAPS) die Ret-P-Man-Aktivität mit guten Ausbeuten solubilisieren können. Innerhalb dieser Gruppe ergab sich eine deutliche Abhängigkeit des Solubilisierungsvermögens von der HLB-Zahl des Detergens. Unter HLB (= Hydrophil-lipophil-Balance) versteht man eine rechnerische Größe, die aus der Detergensstruktur abgeleitet ist und nach: % hydrophiler Anteil / 5 berechnet wird (Produktinformation Atlas Chemie, 1982). Detergentien mit der höchsten Ret-P-Man-Aktivität im Überstand hatten HLB-Zahlen zwischen 12.5 und 15.5 (Abb. 19). Detergentien mit HLB <11 (kaum noch wasserlöslich) und HLB >17 (sehr hydrophil) zeigten nur noch schwache Solubilisierungseigenschaften.

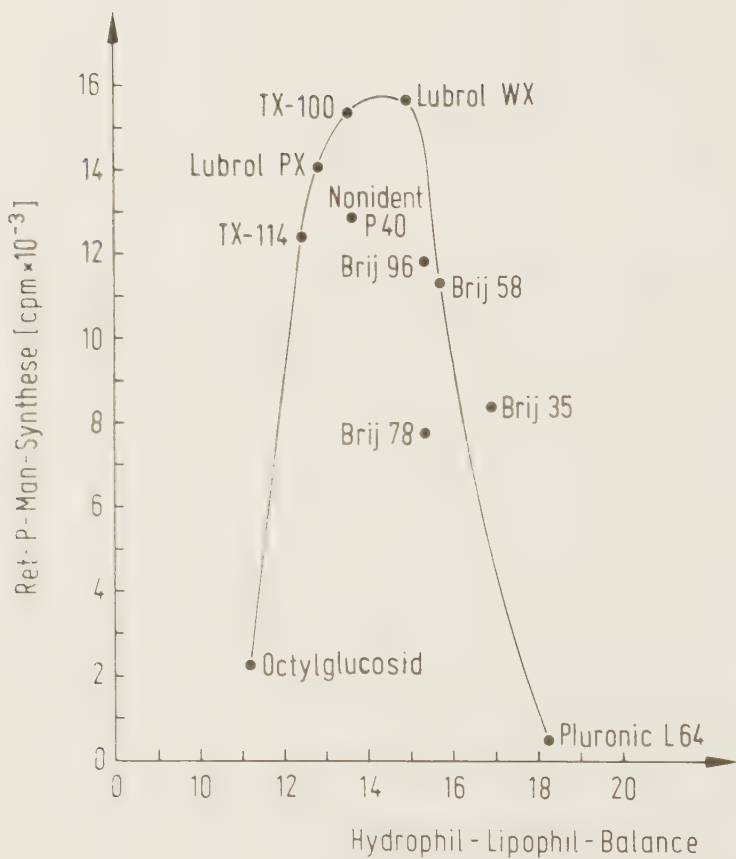


Abb. 19: Zusammenhang zwischen der HLB-Zahl nichtionischer Detergentien und dem Solubilisierungsvermögen für die Ret-P-Man-Synthase

Die Solubilisierungsüberstände mit den höchsten Aktivitäten wurden einem zusätzlichen Test unterworfen, der die Sensitivität des Enzyms gegenüber dem verwendeten Detergens klären sollte. Dazu wurde im Inkubationsansatz bei konstant gehaltener Proteinkonzentration die Detergenskonzentration verdoppelt und die Auswirkung auf die Ret-P-Man-Synthese untersucht.

Tab. 6 : Aktivität der Ret-P-Man-Synthase bei erhöhter Detergenskonzentration im Standardtest

Detergens	Struktur- abkürzung	HLB- Zahl	Ret-P-Man (cpm)	% cpm in doppl.Det.
1% Triton X-100	tert.C ₈ PhE _{9.5}	13.5	15 423	43
1% Triton X-114	tert.C ₈ PhE _{7.8}	12.4	12 437	46
2% Triton X-165	tert.C ₈ PhE ₁₆	16.0	5 123	88
1% Lubrol PX	C ₁₂₋₁₄ E _{9.5}	12.8	14 071	30
2% Lubrol WX	C ₁₆₋₁₈ E _{16.4}	14.9	15 686	85
2% Emulphogen	C ₁₃ E ₁₀	13.0	11 209	27
2% Brij 35	C ₁₂ E ₂₃	16.9	8 340	101
2% Brij 56	C ₁₆ E ₁₀	12.9	14 273	61
2% Brij 58	C ₁₆ E ₂₀	15.7	11 200	118
2% Brij 78	C ₁₈ E ₂₀	15.3	7 644	99
2% Brij 96	C _{18:1} E ₁₀	12.5	11 807	47
2% Brij 98	C _{18:1} E ₂₀	15.3	8 439	112

Erläuterung: HLB = Hydrophil-lipophil-Balance (siehe Text)

Ph = Phenyl

C = Kohlenwasserstoffkette

E = Polyoxyethyleneinheit

Zwei Effekte scheinen die Eignung eines Detergens für den hier untersuchten Fall zu bestimmen. Zum einen wurde eine aliphatische Kette von mindestens C_{14} - besser C_{16} -Länge benötigt, die einen intermizellaren, hydrophoben Raum von ziemlich genau der Dicke einer biologischen Membran schafft (Tanford & Reynolds, 1976). Zum anderen hing die Sensitivität des Enzyms gegenüber höheren Detergensenkonzentrationen eindeutig von der Länge der Polyoxyethylenketten ab (siehe Tab. 6). Detergentien mit $E \leq 10$ bewirkten einen starken Abfall der Aktivität bei 1:1 Verdünnung, während die Ret-P-Man-Synthese in solchen mit $E = 20$ nicht inhibiert wurde. Die GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase stellt damit eines der sehr wenigen bekannten Enzyme dar, für das sich eine klare Struktur-Funktions-Beziehung der Detergens-Solubilisierung aufstellen läßt (Helenius et al., 1979).

Als vielversprechendstes Detergens wurde für die folgenden Versuche Brij 58 ausgewählt, da, wie aus Tab. 6 hervorgeht, in doppelter Detergensenkonzentration sogar noch eine Steigerung um 20% zu beobachten war.

Die Dol-P-Man-Syntheseraten waren im 2% Brij 58-Überstand im Vergleich zu TX-100 sehr gering (5.1%). Inkubation der mikrosomalen Vesikel in 0.5% Brij 58 ohne Abzentrifugieren lieferte ebenfalls nur 7% des TX-100-Wertes unter denselben Bedingungen. Daraus ist zu schließen, daß die niedrigen Dol-P-Man-Syntheseraten im Brij 58-Überstand keine selektive Extraktion, sondern eine Inhibition des Dol-P-Man-Enzyms durch das Detergens darstellen. Im Einklang mit dieser These konnte durch Zugabe von TX-100 zum Brij 58-Überstand ein Teil der Aktivität wiederhergestellt werden (Maximal 52% bei TX-100/Brij 58 = 2.0-2.5). Qualitativ dieselben Ergebnisse erhielt man mit Brij 78 ($C_{18}E_{20}$) und Lubrol WX (C_{16} - $E_{16.4}$).

Dieses Ergebnis kann bereits als Hinweis auf zwei Enzyme mit verschiedener Spezifität bezüglich des Lipid-P-Substrates

angesehen werden. Die Brij-Detergentien ähneln mit ihrer langgestreckten Struktur anscheinend viel eher dem C_{80} - bis C_{100} -Isoprenoidalkohol Dolichol als dem viel kompakteren Retinolmolekül und können daher möglicherweise mit der Bindungsstelle der Dol-P-Man-Synthase konkurrieren.

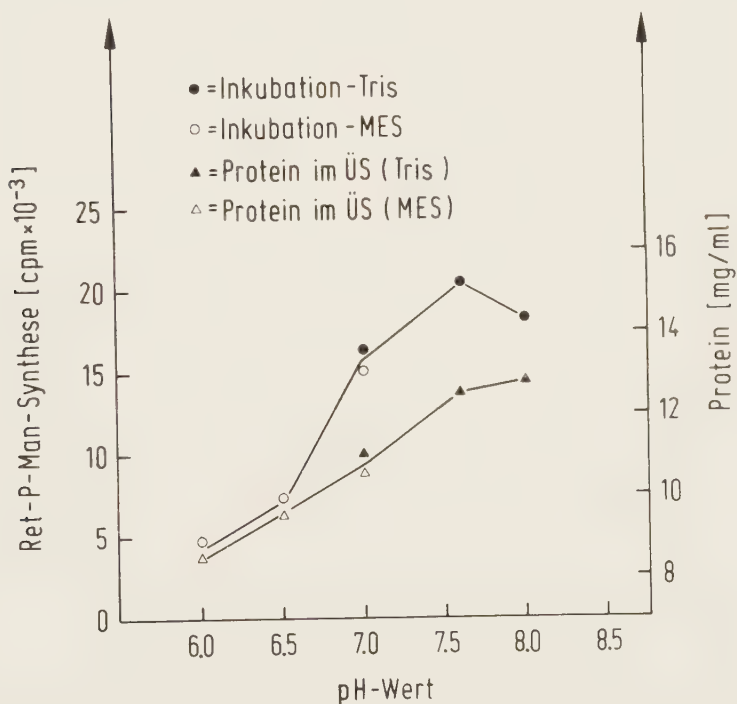


Abb. 20: p_H -Abhängigkeit der Solubilisierung für Ret-P-Man und Dol-P-Man. Standardbedingungen mit 20 μ l ÜS 2% Brij 58 und 0.05 μ Ci GDP-Man. Tests jeweils bei p_H 7.6 .

Die Solubilisierung war deutlich p_H -abhängig (Inkubation jeweils bei p_H 7.6) mit einem Gipfel bei p_H 7.6 sowohl für die Ret-P-Man- als auch für die Dol-P-Man-Bildung (Abb. 20). Kinetiken des Solubilisierungsverhaltens zeigten, daß bereits nach 5 min sämtliche extrahierbare Ret-P-Man- und ca. 2/3 der Dol-P-Man-Aktivität im Überstand zu finden war, so daß nur noch 5 min. mit Brij 58 inkubiert und dann zentrifugiert wurde.

4.1.3 Charakterisierung der solubilisierten GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferase

Mit den in 4.1.2 beschriebenen Versuchen wurde erstmals die Solubilisierung beider GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferasen in relativ stabiler Form erreicht. Im folgenden wurden Untersuchungen über die charakteristischen Eigenschaften der solubilisierten Enzyme unternommen, wobei die Betonung auf der Suche nach Hinweisen für das Vorhandensein eines, von der Dol-P-Man-Synthase unabhängigen Ret-P-Man-synthetisierenden Enzyms, lag.

a) Kinetik

Unter Standardbedingungen wurde die Kinetik der Ret-P-Man- und Dol-P-Man-Bildung verfolgt (Abb. 21).

Im Fall von Ret-P-Man wurde ein linearer Anstieg bis ca. 5 min Inkubationsdauer, gefolgt von einem Plateau bis 15 min und einem Abfall bis 60 min gefunden. Nach Erreichen des Plateaus, ließ sich die Ret-P-Man-Synthese durch eine 2. Zugabe sowohl von Ret-P (um 61%) als auch von GDP-(^{14}C)Man (um 36%) oder Protein (um 60%) steigern. Dol-P-Man zeigte in ähnlichen Experimenten etwas geringere Effekte besonders im Bezug auf die Lipidphosphat-Zugabe, die nur eine Steigerung um 25% brachte.

Die Kinetik der Dol-P-Man-Bildung verlief nur bis etwa 3 min

streng linear und erreichte eine Sättigungsphase erst nach 15 min (Ret-P-Man 5 min). Der Hauptunterschied lag jedoch im Verhalten bei längeren Inkubationszeiten, wo man bei Dol-P-Inkubationen einen stetigen leichten Anstieg der Produktbildung bis 60 min (12% über dem 15 min-Wert) fand, während die Ret-P-Man-Synthese in dieser Zeit stark abfiel (43% unter den 15 min-Wert).

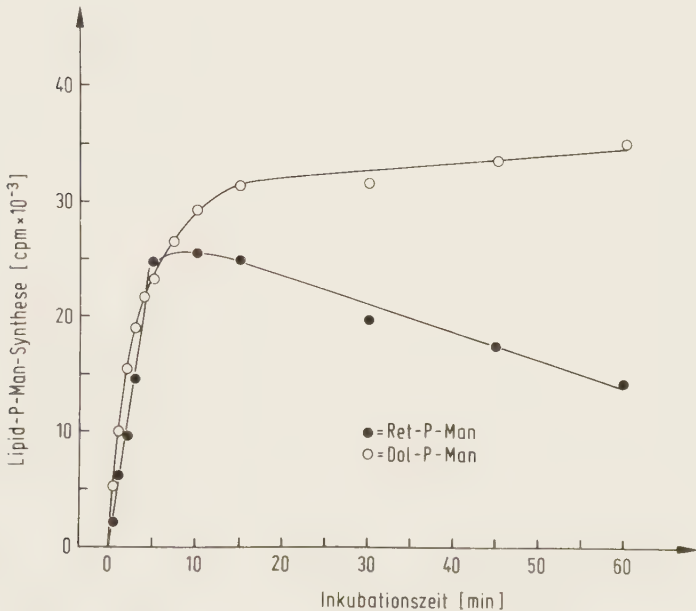


Abb. 21: Kinetik der Ret-P-Man/Dol-P-Man-Bildung im Überstand nach 2% Brij 58. Standardbedingungen.

Dieser Abfall ist zum Teil wahrscheinlich auf Hydrolyse der schon gebildeten Retinyl-phospho-mannose zurückzuführen, was

an der Erhöhung des Peaks I im HPLC-Test zu erkennen war. Zum anderen Teil könnte jedoch eine Weiterreaktion des Ret-P-Man durch Transfer von Mannose auf endogene Glycoproteine (siehe 4.4.) für die beobachteten niedrigeren Ret-P-Man-Werte bei längeren Inkubationsdauern verantwortlich sein.

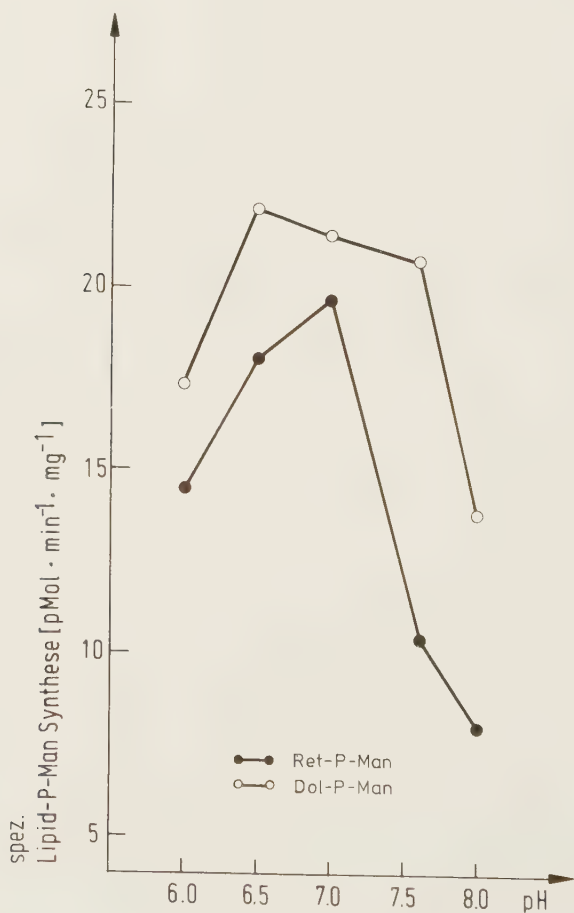


Abb. 22: Abhängigkeit der Ret-P-Man/Dol-P-Man-Bildung vom p_H -Wert des Inkubationsansatzes mit ÜS 2% Brij 58.

b) pH-Abhängigkeit

Aus Abb. 22 ist zu ersehen, daß sich beide Enzyme deutlich in ihren p_H -Optima unterscheiden. Während die Ret-P-Man-Synthase ein scharfes p_H -Optimum bei p_H 7.0 aufwies, zeigte sich bei Dol-P-Man ein sehr breiter p_H -Gipfel mit einem Maximum bei p_H 6.5 .

c) Proteinabhängigkeit

Die solubilisierete Ret-P-Man-Aktivität nahm linear mit steigender Proteinkonzentration bis zu einem Wert von 10 mg/ml (Maximalkonz. im Test) zu (Abb. 23). Ein ungewöhnlicher Verlauf wurde dagegen für die Proteinabhängigkeit der Dol-P-Man-Synthase gefunden. Diese stieg in einer sigmoidalen Kurve bis zur Konzentration von 2 mg/ml an und fiel dann nach 3.5 mg/ml wieder ab. Dabei könnte der sigmoidale Anstieg auf einen Effekt des Triton X-100 im Dol-P-Man-Test,

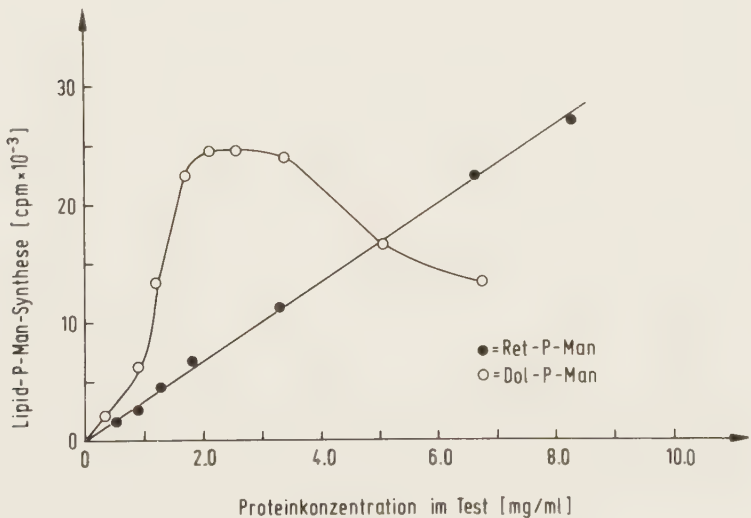


Abb. 23: Proteinabhängigkeit der solubilisierten Ret-P-Man bzw. Dol-P-Man-Synthase unter Standardbedingungen.

das im Ret-P-Man-Test fehlt, zurückzuführen sein. Da die Detergensenkonzentration konstant bei 0.5% gehalten wurde, ergab sich anfangs ein Überschuß Detergens gegenüber Protein, was wahrscheinlich zu einer Inhibition und den beobachteten relativ zu niedrigen Syntheseraten bei niedriger Proteinkonzentration führt (siehe auch Abb. 16). Der Abfall der Aktivität mit höherer Proteinkonzentration läßt sich schwieriger erklären, hängt aber scheinbar mit dem als Solubilisierungsmittel verwendeten Brij 58 zusammen, da Dol-P-Man-Tests in 1% CHAPS statt Brij 58 zumindestens bis 3 mg/ml (höchstmögliche Konz. unter Standardbed.), abgesehen vom sigmoidalen Anfang, eine lineare Abhängigkeit ergaben.

d) Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen

Beide Enzymaktivitäten ließen sich durch Zugabe von Mn^{2+} oder Mg^{2+} stimulieren (Abb. 24). Im Gegensatz zur Dol-P-Man-Synthase, die auch ohne Zusatz von Me^{2+} noch relativ gute

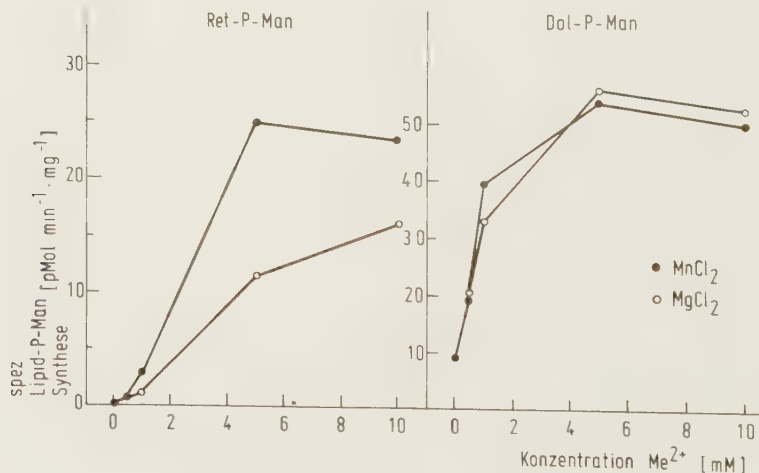


Abb. 24: Abhängigkeit der Ret-P-Man/Dol-P-Man-Aktivitäten von der Mn^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Konzentration

Syntheseraten erreichte, zeigte das Ret-P-abhängige Enzym einen absoluten Bedarf an zweiwertigen Kationen. Dabei war Mn^{2+} mit der optimalen Konzentration von 5 mM doppelt so effektiv wie Mg^{2+} , während im Dol-P-Man-Fall keine Präferenz für ein Kation zu beobachten war.

e) Lipidphosphat-Abhängigkeit

Inkubationen mit steigender Konzentration an Ret-P bzw. Dol-P im Testansatz führten zu typischen Sättigungskurven. Aus Abb. 25 ist zu ersehen, daß unter Standardbedingungen, mit limitierender Konzentration an GDP- (^{14}C) Man ($0.05 \mu Ci = 1.86 \mu M$), die eingesetzte Menge an Lipid-Phosphat im Sättigungsbereich lag. Eine Bestimmung des K_M -Wertes bezüglich Lipid-P erschien nicht sinnvoll, da die nur begrenzte Löslichkeit der Substrate keine aussagekräftige Berechnung dieser Größe erlauben würde.

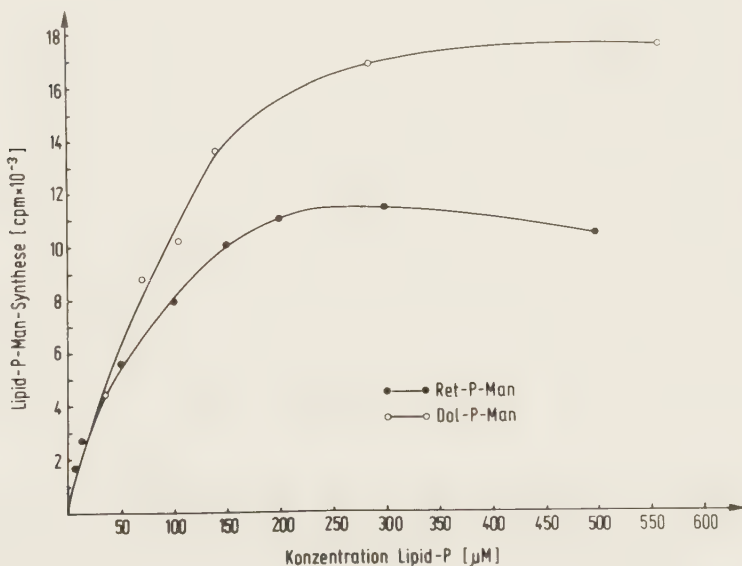


Abb. 25: Abhängigkeit der Ret-P-Man/Dol-P-Man-Synthese von zugesetztem Ret-P bzw. Dol-P.

f) K_M-Wert-Bestimmung für GDP-Mannose

Zur Bestimmung des K_M-Wertes einer Zwei-Substrat-Reaktion, wie im Fall der Lipid-P-Man-Synthasen, muß die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration eines Substrats bei konstanter Konzentration des zweiten Substrates gemessen werden. Verschiedene Konzentrationen des zweiten Substrats liefern dann eine Kurvenschar, aus der der K_M-Wert berechnet werden kann. Einfacher kommt man dort zum Ziel, wo es möglich ist, ein Substrat in hohem Überschuß anzubieten. Dies führt zur Vereinfachung der Michaelis-Menten-Gleichung, so daß man aus nur einer Abhängigkeitskurve des zweiten Substrats den K_M-Wert erhält. Da Versuch 4.1.3 e) gezeigt hat, daß sich bei Standardinkubationen die Ret-P-Konzentration weit in der Sättigung befindet, wurde unter diesen Bedingungen die GDP-(¹⁴C)Man-Konzentration variiert und die Ret-P-Man-Synthese gemessen (Abb. 26).

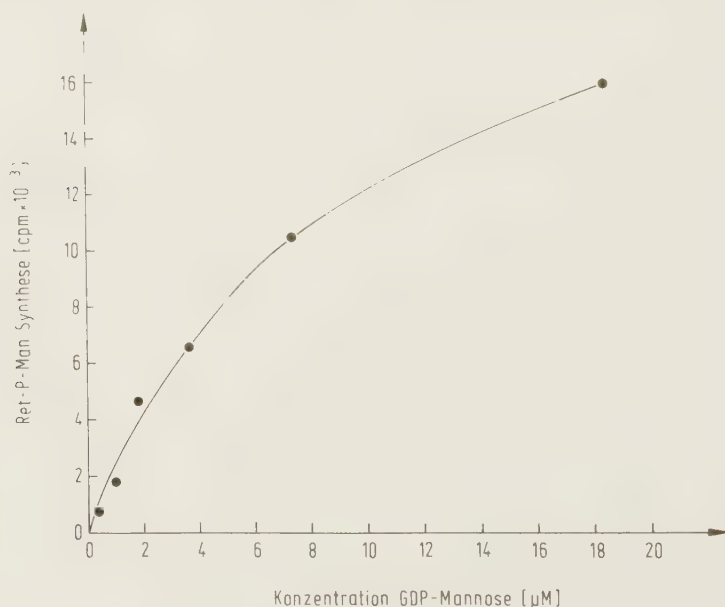


Abb. 26: Ret-P-Man-Synthese bei steigender GDP-(¹⁴C)Man-Konzentration. Bedingungen: Standardtest, jedoch 10 μl ÜS 2% Brij 58 und Inkubationsdauer 2 min.

Ein zusätzlicher Test bei 18.5 μM GDP-Man mit doppelter Ret-P-Konzentration ergab keine signifikante Erhöhung der Aktivität. Daraus folgt, daß auch bei dieser relativ hohen GDP-Man-Konzentration die Ret-P-Menge des Standard-Tests nicht limitierend wird.

Auftragung der gemessenen Syntheseraten nach Lineweaver-Burk (Abb. 27) ergab:

$$K_M = 15.6 \mu\text{M}$$

Dieser Wert liegt in einem Bereich, wie er für viele Glycosyltransferasen gefunden wird und entspricht ungefähr dem Wert von 12.5 μM , der mit mikrosomaler Membranfraktion bestimmt wurde (Shidoj et al., 1981). Die Dol-P-Man-Synthase zeigt in Mikrosomen eine fast 10-fach höhere Affinität gegenüber GDP-Man mit einer K_M von 1.7 μM .

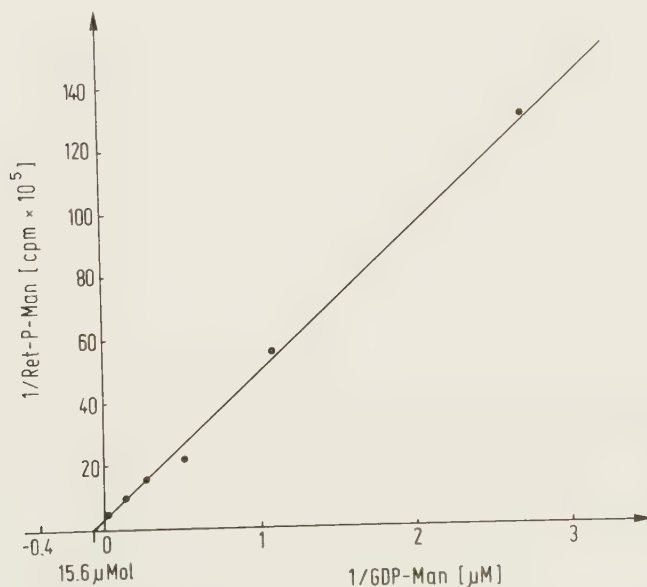


Abb. 27: K_M -Wert-Bestimmung durch Lineweaver-Burk-Auftragung

In der Rattenleber wurden Konzentrationen von 50-100 μM an endogener GDP-Mannose bestimmt (Akamatsu & Hasegawa, 1980). Der im Vergleich zum Dol-P-abhängigen Enzym relativ hohe K_M -Wert gegenüber GDP-Man für die Ret-P-Man-Synthase liegt damit immer noch weit unter der zur Verfügung stehenden Menge an Substrat. Dies legt den Schluß nahe, daß Ret-P unter physiologischen Bedingungen Mannose von GDP-Mannose über die Ret-P-Man-Synthase akzeptieren kann.

4.1.4 Subzelluläre Verteilung der Enzymaktivitäten

Mit Hilfe von hochgereinigten Rattenleberfraktionen aus dem Labor von Sidney Fleischer (zur Reinheit dieser Fraktionen siehe 3.3.2) war es möglich die subzelluläre Verteilung der beiden Lipid-P-Mannosyltransferasen zu untersuchen.

Dazu wurden die einzelnen Fraktionen in Standardinkubationen mit 20 μl Protein in 0.25 M Sucrose/10 mM HEPES p_H 7 und 0.1 μCi GDP-(^{14}C)Mannose, aber ohne BSA-Zusatz auf Ret-P-Man- und Dol-P-Man-Syntheseaktivität getestet. Das Ergebnis der, auf gleiche Proteinkonzentration normierten, Aktivitäten ist in Abb. 28 als Prozentsatz des Maximalwertes festgehalten.

Im Cytoplasma, das alle löslichen Proteine enthält, war keinerlei Lipid-P-Man-Synthese detektierbar. Ähnliches gilt für die beiden mitochondrialen Fraktionen, in denen <1% des Maximalwertes, sowohl für Ret-P-Man als auch für Dol-P-Man, gefunden wurde. Beide Enzyme zeigten die höchsten Syntheseraten in Membranfraktionen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Dabei lag der Höchstwert für Ret-P-Man im glatten endoplasmatischen Retikulum (SER), der für die Dol-P-Man-Synthese im rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER). Insgesamt waren die spezifischen Aktivitäten mit 243 000 cpm/mg für Ret-P-Man im SER und 178 000 cpm/mg für Dol-P-Man im RER

sehr hoch und entsprachen einer Anreicherung von 11-fach (Ret-P-Man) bzw. 9-fach (Dol-P-Man) gegenüber dem Homogenat.

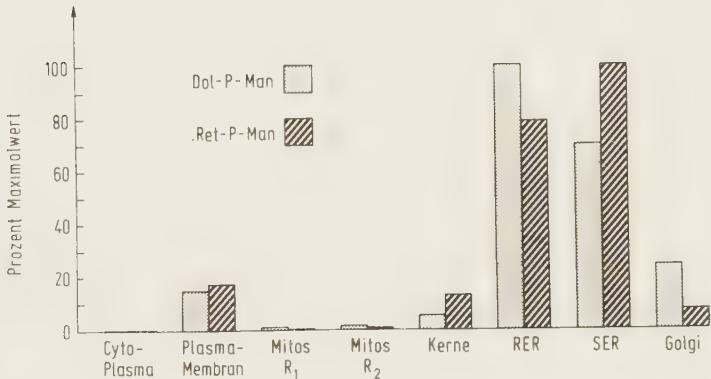


Abb. 28: Verteilung der Lipid-P-Man-Syntheseaktivitäten in einzelnen Fraktionen der Rattenleber. Abkürzungen: Mitos R₁=schwere Mitochondrien, Mitos R₂=leichte Mitochondrien, RER=Rauhes endoplasmatisches Retikulum, SER=Glatte endoplasmatisches Retikulum. Ret-P-Man: 100% = 243 000 cpm/mg, Dol-P-Man: 100% = 178 000 cpm/mg.

Der größte Unterschied zwischen beiden Enzymen betraf den Golgi-Apparat, wo für die Dol-P-Man-Synthese fast 25% des Maximalwertes gemessen wurden. Dagegen war die Ret-P-Man-Aktivität in dieser Fraktion wenig signifikant, sondern spiegelte innerhalb der Fehlergrenzen die Kontamination des Golgi-Apparates durch ER wider (vgl. Tab. 7).

Tab. 7 : Vergleich der Verteilung von ER-Marker
(Cholsäure:CoA-Ligase) und Ret-P-Man-Synthese

Fraktion	Cholsäure:CoA-Liq. (% Maximalwert)	Ret-P-Man-Syn. (% Maximalwert)
Cytoplasma	3.9	0
Plasmamembran	13.0	17.3
Mitos R1	0	0.6
Mitos R2	0.1	1.0
Kerne	15.7	13.4
RER	97	79
SER	100	100
Golgi	4.9	7.4

Erläuterung der Abkürzungen: siehe Abb. 28

Aus Tab. 7 ist ebenso ersichtlich, daß die Syntheseaktivitäten der anderen subzellulären Fraktionen im wesentlichen auf ER-Kontaminationen zurückzuführen sind.

Die Resultate, die an mitochondrialen Fraktionen für das Dol-P-abhängige Enzym erhalten wurden, stehen im Gegensatz zu Literaturdaten (Coolbear et al., 1979), wo sogar die höchste Dol-P-Man-Syntheserate (150% des RER-Wertes) in Mitochondrien gefunden wurde. Der wahrscheinliche Grund für diese Diskrepanz liegt in Unterschieden der experimentellen Durchführung. Auffällig ist, daß die publizierten Syntheseaktivitäten, auf gleiche Bedingungen umgerechnet, nur weniger als 10% der hier erreichten Aktivitäten betragen. Coolbear et al. benutzten zum Dol-P-Man-Test eine Vorinkubation des Ansatzes von 5 min. bei 37 °C ohne GDP-Mannose. Dabei baut wahrscheinlich die hochaktive Dolichylphosphatphosphatase (Appelkvist et al., 1981) einen Großteil des Substrates ab. Da der Hauptwirkungsort dieser Phosphatase in

mikrosomalen Membranen liegt und mitochondriale Fraktionen nur geringe Dol-Pase-Aktivität besitzen, kann der von Coolbear et al. beobachtete Effekt der relativ höchsten Dol-P-Man-Synthese in Mitochondrien wohl durch einen spezifischen Abbau des Substrats Dol-P in Mikrosomen während der Vorinkubation erklärt werden. Zudem finden sich in der zitierten Arbeit keinerlei Angaben über die Reinheit der verwendeten subzellulären Fraktionen, so daß der Einfluß eventueller Kontaminationen nicht abzuschätzen ist.

Bezüglich der Ret-P-Man-Synthase wurde von Smith et al. über die subzelluläre Verteilung der Enzymaktivitäten berichtet (Smith et al., 1979). Dort zeigte sich die Maximalaktivität im RER mit nur 29% im SER, dafür aber 21% im Golgi-Apparat. Bei diesen Experimenten wurde jedoch 0.25% TX-100 verwendet, was, nach den hier vorgelegten Ergebnissen, die Ret-P-Man-Aktivität bereits um 85% inhibiert (siehe Abb. 16). Außerdem muß angemerkt werden, daß die von Smith et al. verwendeten subzellulären Fraktionen, verglichen mit den von S. Fleischer präparierten, stärker kontaminiert waren. So fanden sich dort 63% des Golgi-Markerenzym in der SER-Fraktion (Fleischer: 15%) und 11% des ER-Markerenzym in der Golgi-Fraktion (Fleischer: 5%). Die erste Verunreinigung könnte die publizierten niedrigen SER-Werte erklären, während die ER-Kontamination im Golgi umgekehrt wohl für die relativ hohe Aktivität in dieser Fraktion verantwortlich ist.

Das Ergebnis für Dol-P-Man (höchste Aktivität der Synthese im RER) war nach den schon bekannten Fakten über den Ablauf der Oligosaccharid-Biosynthese (siehe 2.1.4) erwartet worden. Da postuliert wird, daß Dol-P-Man am cotranslationalen Aufbau des lipidgebundenen 14er-Oligosaccharids durch Übertragung der Mannosen 6 bis 9 beteiligt ist (siehe Abb. 2), sollte die höchste Syntheserate im RER zu finden sein. Die Tatsache, daß das Maximum für die Ret-P-Man-Synthese in der SER-Fraktion gefunden wurde, könnte auf einen von Dol-P verschiedenen Wirkungsweg hindeuten, der dann eher im

Bereich der posttranslationalen Modifikationen liegen würde.

Die Unterschiede zwischen RER und SER für beide Enzyme waren zwar signifikant, jedoch mit 20-30% relativ gering (siehe Abb. 28). Da kein Markerenzym bekannt ist, das zwischen RER und SER unterscheiden kann, läßt sich über Differenzen in

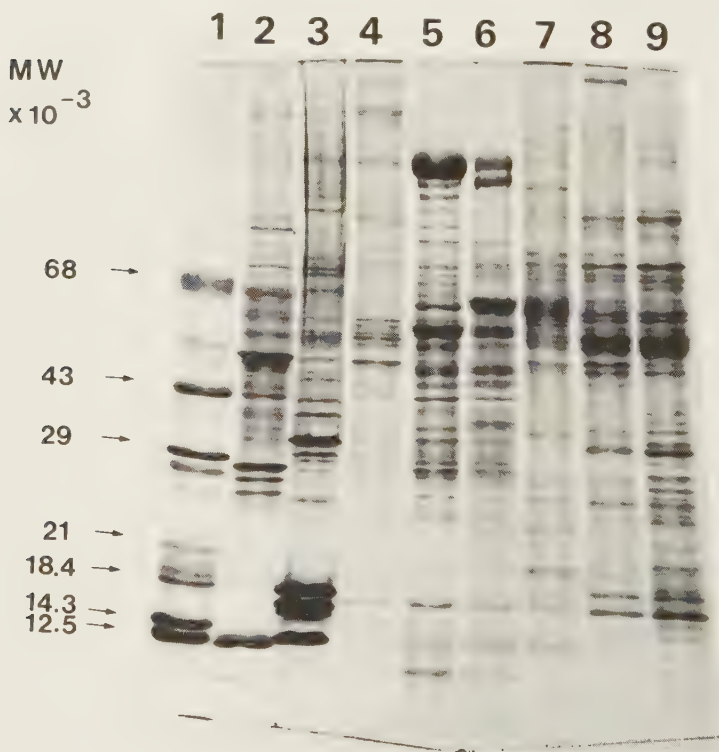


Abb. 29: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der subzellulären Fraktionen aus Rattenleber. Markerproteine (1), Cytoplasma (2), Kerne (3), Plasmamembran (4), schwere Mitochondrien (5), leichte Mitochondrien (6), Golgi (7), SER (8), RER (9).

der Charakteristik beider Fraktionen wenig aussagen. Die SER-Fraktion zeichnet sich jedoch durch eine etwas höhere Kontamination mit Markerenzymen für andere Fraktionen, besonders aber für den Golgi-Apparat (8-fach erhöht gegenüber RER) aus. Eine SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese der subzellulären Fraktionen (Abb. 29) zeigte ebenfalls nur sehr geringe Unterschiede im Bandenmuster zwischen beiden Typen des endoplasmatischen Retikulums, so daß die physiologische Bedeutung der beobachteten verschiedenen Lipid-P-Man-Aktivitäten noch weiterer Untersuchungen bedarf.

4.1.5 Endogenes Ret-P

Auf Grund der hohen Effektivität der Mannoseübertragung in der BSA-Inkubation ohne Detergens und der hohen Sensitivität des HPLC-Tests, erschien es möglich, endogenes Ret-P nach Inkubation mit GDP-(^{14}C)Mannose als Ret-P-(^{14}C)Man nachzuweisen. Dazu wurden Standard-BSA-Inkubationen ohne exogenes Ret-P, jedoch mit 0.2-0.4 μCi GDP-Mannose angesetzt und auf Ret-P-Man-Aktivität getestet.

Gut detektierbare Ret-P-Man-Bildung wurde nur gefunden, wenn die Aufarbeitung der Rattenleber im Rotlicht stattfand. Tab. 8 zeigt, daß die Mikrosomenpräparation bei Tageslicht zu einer Reduktion der Ret-P-Man-Synthese aus endogenem Ret-P auf 14% führte, wobei die Ret-P-Man-Syntheseaktivität mit exogen zugesetztem Ret-P unverändert blieb. Die bei normaler Aufarbeitung erreichte Syntheserate von 107 ± 21 cpm lag knapp an der Nachweisgrenze des Testsystems. Eine ähnliche Reduktion, wenn auch nur um ca. 50%, wurde erhalten, wenn die Rotlicht-Mikrosomenpräparation für einige Stunden dem Tageslicht ausgesetzt wurde. Wiederum war keine Änderung in der Ret-P-Man-Synthese mit exogenem Ret-P festzustellen.

Die Bildung von Dol-P-Man aus endogenem Dol-P zeigte dagegen keinen Unterschied zwischen Rotlicht- und Tageslichtaufarbeitung bzw. beim Stehenlassen der Rotlicht-Mikrosomen im Tageslicht.

Tab. 8 : Ergebnisse von Inkubationen ohne exogenes Substrat

Bedingungen	Ret-P-Man (cpm)	Dol-P-Man (cpm)
Präparation von Mikrosomen im Rotlicht	789	3746
Präparation von Mikrosomen im Tageslicht	107	3830
Rotlicht-Mikrosomen im Tageslicht	392	3619

Bedingungen: Standard-BSA-Test an MF, 0.2 μ Ci

Folgende Ergebnisse legten, auf Grund der Labilität und Lichtempfindlichkeit von synthetischem Ret-P (siehe 3.4.1) eine Identifizierung der gefundenen cpm-Werte als Ret-P-Man nahe:

- Auf der Reversed phase-HPLC-Säule wurde die gleiche Retentionszeit wie für Ret-P-Man aus chemisch synthetisiertem Ret-P gefunden.
- Tageslicht reduzierte die meßbare Mannosylierung des endogenen Substrats stark.

- c) Lagerung bei tiefen Temperaturen ergab eine viel kleinere Halbwertszeit für die Abnahme der Syntheseaktivität mit endogenem Substrat (ca. 1 Monat) als für diejenige mit exogenem Substrat (nach 6 Monaten 85-90% Restaktivität), d.h. endogenes Ret-P ist viel labiler als das Ret-P-Man-synthetisierende Enzym.
- d) Für das stabilere endogene Dol-P wurde weder Lichtempfindlichkeit, noch erhöhte Instabilität bei längerer Lagerung festgestellt.

Unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität der GDP-Mannose wurden mit dieser Methode folgende endogene Substratkonzentrationen erhalten:

Ret-P:	3.2 pMol/mg
Dol-P:	15.7 pMol/mg

Der für Dol-P gefundene Wert ergibt eine Konzentration von 2.7 nMol/10 g Leber und liegt damit im Bereich der von Keller, durch Umsetzung mit Chlorameisensäure-(¹⁴C)phenylester bestimmten 10 nMol/10 g Leber (Keller et al., 1981). Geht man von einem Dolicholgehalt von 89 ng/mg mikrosomalem Protein aus (Rip et al., 1981), so entsprechen die 15.7 pMol Dol-P/mg einem phosphorylierten Anteil von 25%. Der Anteil Ret-P am Gesamtretinolgehalt in Mikrosomen berechnet sich zu 4%, basierend auf einem Wert von 0.37 µg Retinol/mg (Nyquist et al., 1971). Der tatsächliche physiologische Ret-P-Gehalt könnte, wegen der Labilität des Substrats und den damit wahrscheinlich verbundenen Verlusten während der Aufarbeitung, noch um einiges höher sein.

4.1.6 Einbau von ^{32}P aus Ret- ^{32}P in Ret-P-Man

Die Zwei-Substrat-Reaktion von GDP-Mannose und Retinylphosphat zu Retinyl-phospho-mannose kann prinzipiell auf mehreren Wegen stattfinden. Einmal könnte Ret-P-Man durch Spaltung des Pyrophosphates in GDP-Man und Bindung des entstehenden Mannosephosphats am C-15 von Retinylphosphat unter Austritt von PO_4^{3-} entstehen. Denkbar ist aber ebenfalls ein Angriff des Phosphat-Sauerstoffs im Retinylphosphat auf das C-1 der Mannose, wobei Ret-P-Man mit GDP als Nebenprodukt gebildet würde.

Im ersten Fall würde die Phosphatbrücke im Ret-P-Man aus dem GDP der GDP-Mannose, im letzteren dagegen aus dem Ret-P stammen. Zwischen den beiden skizzierten Möglichkeiten läßt sich also durch den Einsatz von markiertem Phosphat, entweder als Ret- ^{32}P oder als β - ^{32}P -GDP-Mannose unterscheiden. Wegen der leichteren Zugänglichkeit wurde Ret- ^{32}P gewählt, dessen Markierung im Ret-P-Man zu finden sein sollte, wenn der Reaktionsmechanismus dem zweiten Weg folgt.

HPLC

30 nMol (8.2×10^6 cpm) chemisch synthetisiertes Ret- ^{32}P (siehe 3.4.2) wurde einem Standardtest auf Ret-P-Mannosyltransferase mit und ohne GDP-Mannose unterzogen. Die Produktbildung wurde mittels HPLC analysiert. Allerdings erwies sich die Identifizierung der Ret- ^{32}P -Man-Bildung als schwierig, da schon Ret- ^{32}P nach Inkubationen ohne GDP-Man als Peak mit ausgeprägter Schwanzbildung eluierte (Abb. 30).

Neben einem Hauptgipfel zwischen 5 und 6 min Retentionszeit erhielt man eine Schulter bei 8 min. Die Aktivität pro 0.5 ml-Fraktion lag nach 20 min immer noch im Bereich von 10 000 cpm ^{32}P , einem Wert der ungefähr dem der erwarteten Ret-P-Man-Menge entsprach.

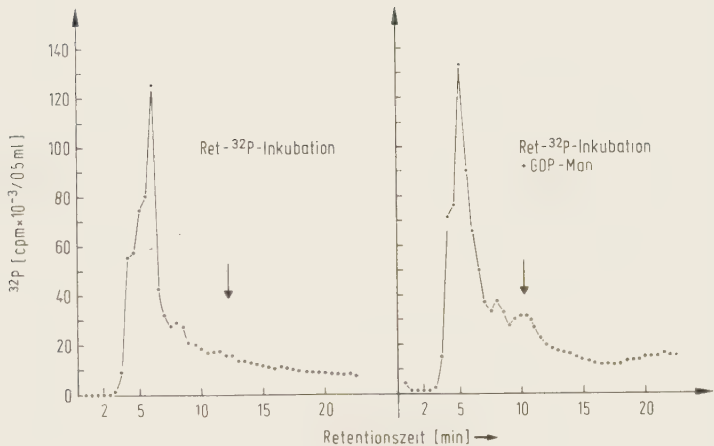


Abb. 30: HPLC-Chromatographie von Inkubationen mit Ret- ^{32}P . 30 nMol Ret- ^{32}P nach Standardinkubation (links: ohne GDP-Man; rechts: 0.2 nMol GDP-Man) und Aufarbeitung in 99% MeOH. Je 100 μl Probe injiziert. Chromatographiebedingungen siehe 3.5.1. Fraktionen von 0.5 min. ---> Position des erwarteten Ret-P-Man.

Inkubationen in Gegenwart von BSA und 0.2 nMol nichtmarkierter GDP-Mannose ergaben einen kleinen zusätzlichen Peak mit 10-11 min Retentionszeit, wie sie für Ret- ^{32}P -Man erwartet wurde. Eine grobe Abschätzung des Gehalts an Ret- ^{32}P -Man in diesem zusätzlichen Peak ergab ca. 29 000 cpm oder 106 pMol. Dies korreliert sehr gut mit dem Wert von 90 pMol, der bei Inkubationen von Ret-P mit GDP-(^{14}C)Man unter denselben Bedingungen gefunden wurden.

DEAE-Sephacel

Wegen der schlechten Abtrennung des Ret- ^{32}P -Man auf der Reversed phase-HPLC-Säule wurde versucht, mit Hilfe von Chromatographie an DEAE-Sephacel bessere Ergebnisse zu erhalten. Ret- ^{32}P eluierte mit 30 mM NH_4OAc von DEAE-Sephacel (siehe 3.4.2), während Ret-P-(^{14}C)Man bereits mit 10 mM NH_4OAc von der Säule kam. Ein C/M-Extrakt der BSA-Inkubation aus 20 nMol Ret- ^{32}P und 4 nMol GDP-Man wurde auf DEAE-Sephacel in 99% MeOH aufgetragen und stufenweise mit NH_4OAc eluiert.

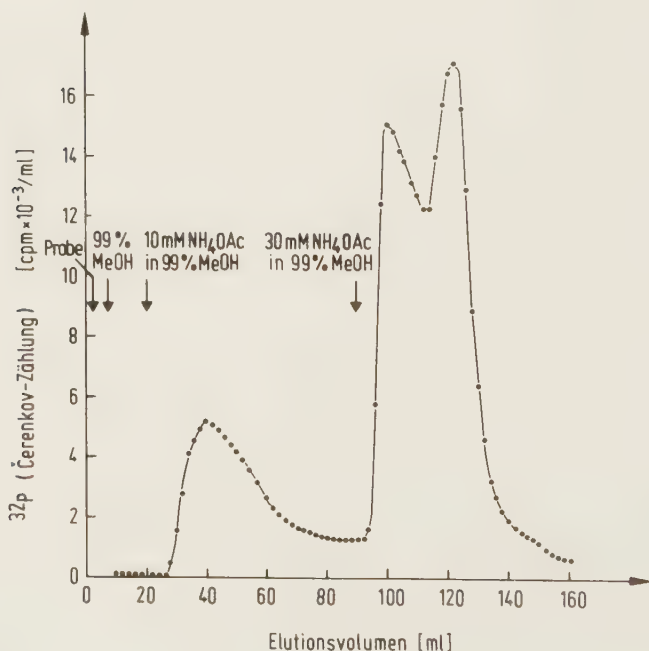


Abb. 31: Chromatographie an DEAE-Sephacel (1x15 cm). C/M-Extrakt einer Inkubation von 20 nMol Ret- ^{32}P und 4 nMol GDP-Man. Pumpe 30 ml/h, Fraktionen zu 1 ml.

Abb. 31 zeigt einen deutlichen Peak im Bereich von 10 mM NH_4OAc , der sich dünnschichtchromatographisch wie $\text{Ret-}^{32}\text{P-Man}$ verhielt. Mit 30 mM Salz konnte die Hauptmenge des $\text{Ret-}^{32}\text{P}$ eluiert werden. Der 10 mM-Peak enthielt 238 500 cpm $\text{Ret-}^{32}\text{P-Man}$ entsprechend 1.73 nMol, also fast exakt die Menge von 1.8 nMol, die bei, gegenüber dem HPLC-Versuch, 20-fach gesteigerter GDP-Man-Konzentration erwartet wurde. Im Gegensatz zum Test ohne BSA (siehe Abb. 26) liegt hier im Fall der BSA-Inkubation offensichtlich noch keine Sättigung bezüglich der GDP-Mannose vor.

Inkubation von $\text{Ret-}^{32}\text{P}$ und $\text{GDP-(}^{14}\text{C)Man}$ lieferte doppeltmarkiertes $\text{Ret-}^{32}\text{P-(}^{14}\text{C)Man}$. Dieses hatte ein Verhältnis $^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$ von 3.10 : 1. Ausgehend von den spezifischen Aktivitäten der Edukte, nämlich 75 mCi/mMol für $\text{Ret-}^{32}\text{P}$ und 269 mCi/mMol für $\text{GDP-(}^{14}\text{C)Man}$, ergibt sich ein theoretisches Verhältnis $^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$ von 3.58 : 1 und damit eine Stöchiometrie (^{14}C)Mannose zu (^{32}P)Phosphat von 0.86 : 1. Zusätzliche geringe Mengen von $\text{Ret-}^{32}\text{P}$, die eventuell schon mit 10 mM NH_4OAc von der DEAE-Säule gespült werden, sind wahrscheinlich für das gefundene geringere Verhältnis der beiden Isotopen verantwortlich. Die Genauigkeit der Messung reicht jedoch aus, um die Aussage einer 1:1 Stöchiometrie von $\text{Ret-}^{32}\text{P}$ zu (^{14}C)Mannose für das Produkt Ret-P-Man treffen zu können.

Es konnte also eindeutig gezeigt werden, daß die Phosphatgruppe in Ret-P-Man aus Ret-P stammt und somit GDP als zweites Reaktionsprodukt entstehen sollte. Als einen indirekten Hinweis auf GDP als Nebenprodukt der Reaktion, kann die Beobachtung einer starken Hemmung der Ret-P-Man -Synthese durch dieses Nukleosiddiphosphat angesehen werden (Abb. 32). Halbmaximale Inhibition wurde unter Standardbedingungen schon mit 43 μM GDP erreicht.

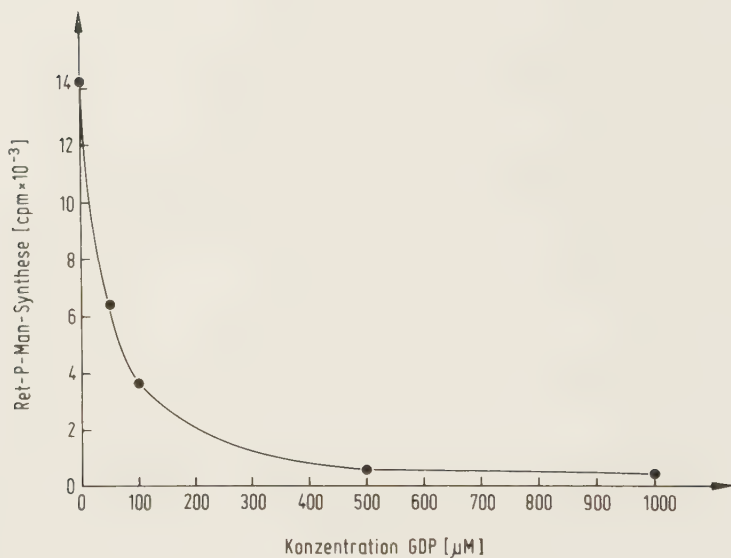


Abb. 32: Inhibition der Ret-P-Man-Synthese im ÜS 2% Brij 58 durch steigende Konzentrationen an GDP. Bedingungen: Standardtest, GDP als 1:1-Komplex mit Mn^{2+} .

Als Konsequenz für den Mechanismus der Reaktion folgt, daß diese als nucleophile Substitution am C-1-Atom der α -Mannose in GDP-Man stattfindet. Nucleophile Substitutionen bedingen oft eine Inversion am chiralen C-Atom, besonders wenn eine Angriffsrichtung sterisch bevorzugt wird (S_{N}^2 -Reaktion). Im Einklang mit dieser Theorie wurde die Konfiguration am C-1 der Mannose in Ret-P-Man als β -Anomeres bestimmt (Rosso et al., 1976).

4.1.7 Proteinmarkierung mit Ret-³²P und Dol-³²P

Chemisch synthetisiertes Ret-³²P (3.4.2) und Dol-³²P (3.4.3) wurden zur Substrat-Markierung der beiden GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferasen eingesetzt. Dazu wurde mikrosomale Membranfraktion mit den markierten Substraten inkubiert und nicht gebundenes Lipid-³²P durch mehrmaliges Waschen und Rezentrifugieren entfernt. Im Überstand nach Solubilisierung in 2% Brij 58 (3.7.4) waren mit Ret-³²P 1 - 2 %, mit Dol-³²P 3 - 4 % des Gesamtproteins markiert. Diese Werte wurden aus der membranassoziierten Markierung pro mg Protein unter der Annahme eines 1:1 Enzym-Substrat-Komplexes und eines Molekulargewichtes von 70 000 D, dem MG-Bereich der meisten bekannten Glycosyltransferasen (Beyer, 1982), berechnet.

Zur Untersuchung der markierten Proteine mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde, basierend auf der Lämmli-Methode (Lämmli, 1970) ein nichtdenaturierendes Gelsystem mit 1% TX-100 entwickelt (3.7.1). Mit Ret-³²P erhielt man dabei, außer Material am Start, nur eine Bande mit relativ geringer Mobilität stark markiert (Abb. 33, Bahn 2). Diese lag auf gleicher Höhe mit einer stark Coomassie-anfärbbaren Bande (Bahn 1). Gele die länger exponiert wurden, zeigten daneben noch 2-3 sehr schwache Banden im mittleren Teil des Trenngels (Bahn 3).

Deutliche Unterschiede waren im Vergleich dazu im Bandenmuster des Solubilisierungsüberstandes nach Inkubation mit Dol-³²P zu erkennen (Bahn 4). Diese bestanden in einer zusätzlichen Bande direkt nach dem Startausfall, einer Bande sehr dicht unterhalb der Ret-³²P-Markierung und dem völligen Fehlen der schwächer markierten Banden mit höherer Mobilität.

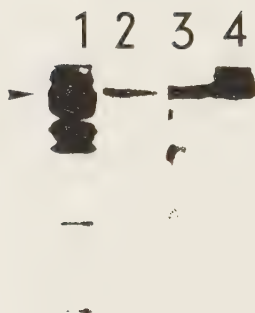


Abb. 33: Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese in 1% TX-100.
 Bahn 1: 20 μ l $\ddot{U}$ S 2% Brij 58 1:1 in Probenpuffer (320 μ g Protein); Coomassie G 250 - Anfärbung. Bahn 2: wie 1, aber mit 13 600 cpm Ret- 32 P, Autoradiographie 1.5 Tage.
 Bahn 3: wie 1, aber mit 30 500 cpm Ret- 32 P, Autoradiographie 6 Tage. Bahn 4: wie 1, aber mit 8930 cpm Dol- 32 P, Autoradiographie 6 Tage.

Die Möglichkeit einer, wie auch immer gearteten, Proteinmarkierung durch kovalent gebundenes Phosphat, konnte durch SDS-Gelelektrophorese ausgeschlossen werden. In beiden Fällen zeigten SDS-Gele autoradiographisch selbst nach langen Expositionszeiten keinerlei Banden.

In einem halbpräparativen Ansatz mit 200 μ l $\ddot{U}$ S 2% Brij 58 wurde nach nativer Gelelektrophorese die, zur Ret- 32 P/Dol- 32 P-Markierung korrespondierende Coomassie-Bande sehr eng

ausgeschnitten und elektro-eluiert (siehe 3.7.2). Ein SDS-Gel des eluierten Proteinmaterials zeigte zwei Hauptbanden mit den apparenten Molekulargewichten 62 000 und 69 000 D (Abb. 34).

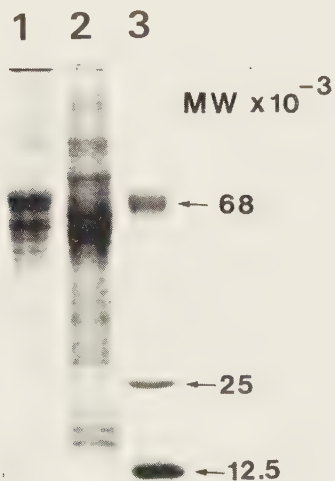


Abb. 34: SDS - Gelelektrophorese nach Elektroelution der Lipid-³²P markierbaren Bande aus nativem TX-100-Gel (Coomassie-Anfärbung). Bahn 1: Elektroeluierte Bande nach TCA-Fällung, in 50 µl Probenpuffer aufgenommen. Bahn 2: Mikrosomale Membranfraktion, 10 µl (250 µg Protein) 1:1 in Probenpuffer. Bahn 3: Markerproteine

Die hier gezeigte spezifische Markierung der beiden Manno-
syltransferasen mit den jeweiligen ^{32}P -markierten Substraten
wurde mit Gelfiltration an AcA 34 (siehe 3.6.3) noch
eingehender untersucht (Abb. 35).

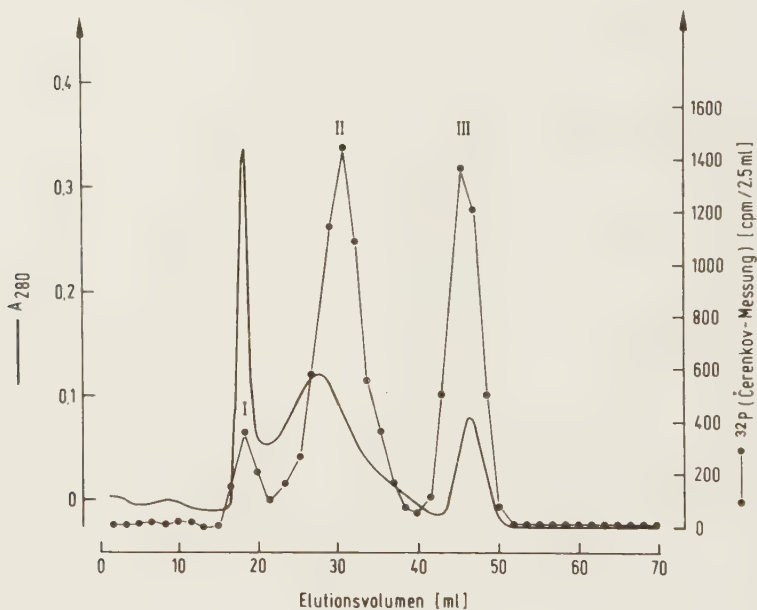


Abb. 35: AcA 34-Gelfiltration von Ret- ^{32}P -markierter mikro-
somalier Membranfraktion nach Solubilisierung in 2% Brij
58. Puffer D mit 20 ml/h. Aufgetragen wurden 100 μl ÜS
2% Brij 58 mit 28 500 cpm Ret- ^{32}P .

Ret- ^{32}P -markierte solubilisierte Membranen zeigten drei
radioaktive Gipfel. Diese wurden als proteingebundenes
Ret- ^{32}P (Peak I), detergensgebundenes Ret- ^{32}P (Peak II) und
freies Ret- ^{32}P bzw. $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ (Peak III) auf der Basis
folgender Befunde identifiziert:

Peak I fiel mit dem Maximum der Ret-P-Man-Syntheseaktivität zusammen (siehe 4.3.3) und enthielt 5 - 10% der Gesamt- ^{32}P -Menge. Reines Ret- ^{32}P in Brij-Puffer fand sich hauptsächlich in Peak II, während die Radioaktivität bei Kontrollversuchen mit ^{32}P -Bis-triethyl-ammoniumphosphat (BTA ^{32}P) in Brij-Puffer ausschließlich mit Peak III eluierte. Direkte Zugabe von Ret- ^{32}P zum Solubilisierungsüberstand (fünffache Menge gegenüber Abb. 35) ergab eine starke Erhöhung für Peak II und III, bei gleichbleibender Aktivität in Peak I. Schließlich erhielt man bei Anwesenheit des Phosphatase-Inhibitor-mixes im Laufpuffer eine starke Verringerung von Peak III auf ca. 8% der Gesamtaktivität zugunsten von Peak II.

Verdrängungsversuche mit bis zu 100-fachem Überschuß an nichtmarkiertem Ret-P ergaben nur maximal 55% Inhibition der Markierung in Peak I. Dies ist wahrscheinlich auf die beschränkte Löslichkeit von Ret-P in Detergens-Puffer zurückzuführen, die schon bei Versuchen mit Zusatz von Ret- ^{32}P beobachtet wurde.

Die spezifische Bindung, ausgedrückt als pMol Ret- ^{32}P /mg Protein, lag im Peak I um den Faktor 10 höher als im Solubilisierungsüberstand. Interessanterweise wurde annähernd derselbe Anreicherungsfaktor ($f=12.2$) unter optimalen Bedingungen bei Tests der Ret-P-Man-Synthese in Peak I nach Gelfiltration an AcA 34 gefunden (siehe 4.3.3).

Untersuchungen mit Dol- ^{32}P zeigten eine ähnliche Verteilung der radioaktiven Peaks. Da die Dol-P-Man-Syntheseaktivität nach AcA 34 wie im Fall des Ret-P-Man im Ausschlußvolumen zu finden war, war es nicht überraschend, daß auch mit Dol- ^{32}P eine Markierung dieser Fraktion gezeigt werden konnte.

Dagegen wurde keine mit dem ersten Proteinpeak zusammenfallende Radioaktivität nach Inkubation mit ^3H -Retinol unter identischen Bedingungen erhalten. Die Markierung im Peak I scheint daher spezifisch für lipidgebundenes Phosphat zu sein.

4.1.8 Kompetitionsversuche

Durch die Entwicklung des HPLC-Testsystems war es möglich, Ret-P-Man- und Dol-P-Man-Synthese gleichzeitig zu messen. Inkubationen bei Anwesenheit von Ret-P und Dol-P sollten nun zeigen, ob sich diese beiden Substrate gegenseitig kompetitiv beeinflussen oder unabhängig voneinander mannosyliert werden.

Bei solchen Experimenten muß sichergestellt sein, daß GDP-Man, das andere, gemeinsame Substrat, nicht als limitierender Faktor wirkt, da in einem solchen Fall die Konkurrenz um dieses Substrat eine eventuelle Konkurrenz um ein Enzym überlagern würde. Für diese Versuche wurde deshalb eine GDP-Mannose-Konzentration von 25 μM (spez. Akt. 53 mCi/mMol) eingesetzt, die oberhalb der K_M für Ret-P-Man und in der Sättigung der GDP-Man-Abhängigkeitskurve (Abb. 26) liegt. Außerdem mußten die Tests wegen der schlechten Wasserlöslichkeit von Dol-P in Anwesenheit von 0.5% TX-100 durchgeführt werden, was die Ret-P-Man-Aktivität deutlich erniedrigte.

Steigende Mengen Dol-P bei konstant gehaltener Ret-P-Konzentration von 30 nMol/Test erbrachten die in Abb. 36 dargestellten Ergebnisse. Die Dol-P-Man-Synthese zeigte, wie erwartet, ein Sättigungsverhalten bei steigender Substratkonzentration. Die Aktivität der Ret-P-Man-Synthese wurde auch durch große Mengen an Dol-P nur leicht gehemmt. Oberhalb Dol-P-Konzentrationen von 280 μM konnte immer noch ein konstanter Wert von 72% der ungestörten Ret-P-Man-Aktivität gemessen werden.

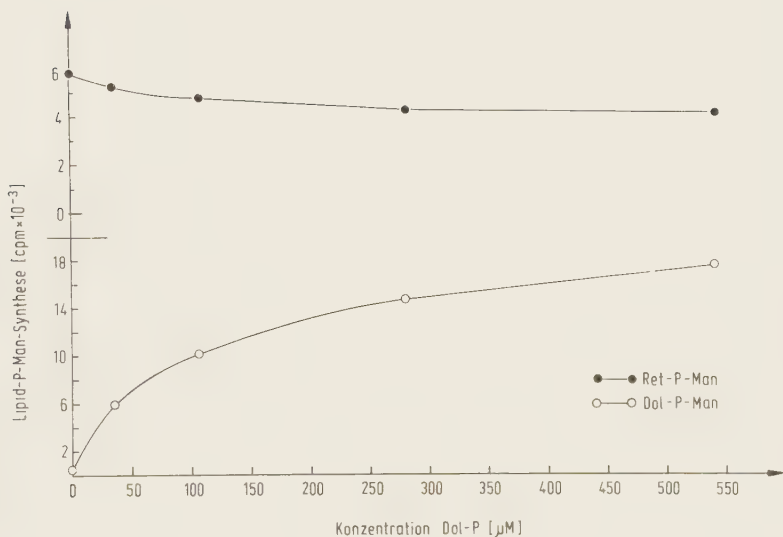


Abb. 36: Konkurrenz von Ret-P und Dol-P. Inkubationen mit 30 nMol Ret-P und steigenden Konzentrationen an Dol-P. Ret-P-Man- und Dol-P-Man-Synthese wurden gleichzeitig verfolgt. Bedingungen: 20 µl ÜS 2% Brij 58, 0.5% TX-100, 2.5 nMol GDP-(¹⁴C)Man (53 mCi/mMol), ansonsten wie Standardtest.

Um die Unabhängigkeit der beiden Enzymaktivitäten zusätzlich zu bestätigen, wurde in einem ähnlichen Experiment die Dol-P-Man-Bildung bei steigendem Dol-P mit und ohne Anwesenheit von Ret-P verglichen. Wäre Ret-P ein kompetitiver Inhibitor der Dol-P-Man-Synthase, sollte in seiner Abwesenheit die Dol-P-Man-Aktivität viel schneller steigen (d.h. kleinerer K_M -Wert); jedoch dieselbe Maximalgeschwindigkeit erreichen. Im Gegensatz dazu ergab das Experiment zwei fast

völlig identische Kurven (Abb. 37).

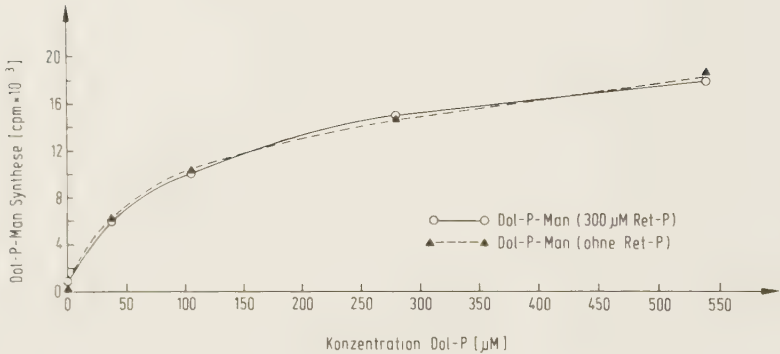


Abb. 37: Vergleich der Dol-P-Man-Synthese mit und ohne Anwesenheit von Ret-P. Bedingungen: wie Abb. 36 .

Daraus muß gefolgert werden, daß beide Lipid-phosphate unabhängig voneinander umgesetzt werden. Allerdings kann mit dieser Methode nicht unterschieden werden, ob diese Unabhängigkeit auf der Anwesenheit zweier Enzyme oder dem Vorhandensein zweier unabhängiger aktiver Bindungsstellen am selben Enzym beruht. Eine Ret-P-spezifische Bindungsstelle an einer GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferase würde jedoch ebenfalls der Theorie eines spezifischen retinolabhängigen Glycosylierungswegs genügen.

4.2 Substratspezifität der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase

4.2.1 Spezifität gegenüber Nucleotoid-Zuckern

In vivo-Versuche mit Vitamin A-Mangeltieren zeigten, wie schon in der Einleitung erwähnt, eine hohe Spezifität des Vitamin A-Effektes auf Glycoproteine bezüglich Mannose (Hassell et al., 1978).

Durch Inkubationen von Mikrosomen mit verschiedenen aktivierten Zuckern wurde die strikte Spezifität der Ret-P-abhängigen Glycosyltransferase für GDP-Mannose, zumindest in diesem in vitro-System, bestätigt (Tab. 9). Im Gegensatz dazu, war Dol-P in der Lage auch Glucose aus UDP-Glucose und N-Acetylglucosamin aus UDP-GlcNAc zu binden.

Tab. 9: Spezifität gegenüber Nucleotidzuckern

Nucleotidzucker	+ Ret-P	+ Dol-P
	spez.Akt. (cpm/mg)	spez.Akt. (cpm/mg)
GDP-Mannose	43 100	100 800
UDP-Glucose	111	38 500
UDP-Galactose	<50	230
GDP-Fucose	<50	560
UDP-GlcNAc	<50	19 600
UDP-GalNAc	<50	195
CMP-Sial	<50	---

Bedingungen: Standardtest an MF, 0.1 μ Ci Nucleotidzucker, Gradienten-HPLC

4.2.2 Spezifität gegenüber Lipid-Phosphat

Untersuchungen über die Spezifität bezüglich des Lipidteils wurden vor allem unter dem Aspekt einer möglichen Rolle der konjugierten Seitenkette im Retinol durchgeführt.

a) Phenylretinylphosphat

3-(4-(2-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexenyl)vinyl)phenyl)2-butenol ("Phenylretinol") wurde freundlicherweise von Elisabeth Kölling, MPI für Biochemie, Martinsried zur Verfügung gestellt. Diese Substanz enthält einen Phenylring in der Seitenkette integriert, der zu einer Störung der Konjugation, ablesbar an einer Blauverschiebung im UV-Spektrum von $\lambda_{\text{Max}} = 325 \text{ nm}$ zu $\lambda_{\text{Max}} = 290 \text{ nm}$, führt (Kölling et al., 1984). Phenylretinol konnte nach der in 3.4.1 beschriebenen Methode phosphoryliert werden. Die Ausbeute nach Reinigung lag bei 37% und damit ungefähr doppelt so hoch wie die für die Stammverbindung Retinol.

Standard-Enzymtests mit Phenylretinylphosphat (Ph-Ret-P) zeigten eine genauso hohe Aktivität in der Reaktion mit GDP-Mannose wie Ret-P (Tab. 10). Allerdings konnte im Unterschied zu Ret-P kein BSA-Effekt beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, daß BSA, wie schon vermutet, das labile Ret-P vor Zerstörung schützen kann. Diese Funktion kommt wahrscheinlich im Falle des viel stabileren Ph-Ret-P nicht zum Tragen, deshalb ist hier nur eine sehr geringe Erhöhung der Aktivität mit BSA zu finden. Auf der anderen Seite folgt aus diesem Ergebnis jedoch, daß Ph-Ret-P nur 43% der mit Ret-P maximal erhaltenen Syntheserate unter den üblichen Testbedingungen erreicht.

Tab. 10: Lipid-P-Man-Bildung mit Ph-Ret-P im Vergleich zu Ret-P

Substrat	- BSA	+ BSA
	Lipid-P-Man (cpm)	Lipid-P-Man (cpm)
Ph-Ret-P	18 122	20 012
Ret-P	20 794	46 690

Bedingungen: Standardtest, 20 μ l MF, 30 μ l BSA (20 mg/ml), 0.05 μ Ci GDP-Man.

b) cis/trans-Isomerisierung von Ret-P

Im Hinblick auf die Bedeutung von cis/trans-Isomerisierungen in vielen Bereichen von Retinoidwirkungen (Sehprozess, Bakteriorhodopsin), war die Fragestellung nach einem Effekt der cis/trans-Isomerisierung auf die Aktivität als Substrat der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase besonders interessant.

Die Strategie dieses Experimentes war, eine Methode zur Trennung von cis/trans-Ret-P zu finden, cis-Ret-P durch Belichtung von trans-Ret-P anzureichern, dieses von der trans-Verbindung abzutrennen und im Ret-P-Man-Synthesetest einzusetzen.

Die Trennung von cis- und trans-Ret-P gelang nach der in 3.4.5 beschriebenen Methode mit Ionenpaarchromatographie (PIC) auf Reversed phase-HPLC. Abb. 38 zeigt HPLC-Chromatogramme von unbelichteten und belichteten Ret-P-Proben (Belichtungsbedingungen siehe 3.4.5). Aus diesen wird die gute Trennung von cis und trans-Ret-P deutlich.

Tsukida und Saki (1982) konnten NMR-spektroskopisch nachweisen, daß bei Bestrahlung von Ret-P zuerst das 13-cis-Isomere entsteht. Das im HPLC-Chromatogramm als Peak mit kürzerer

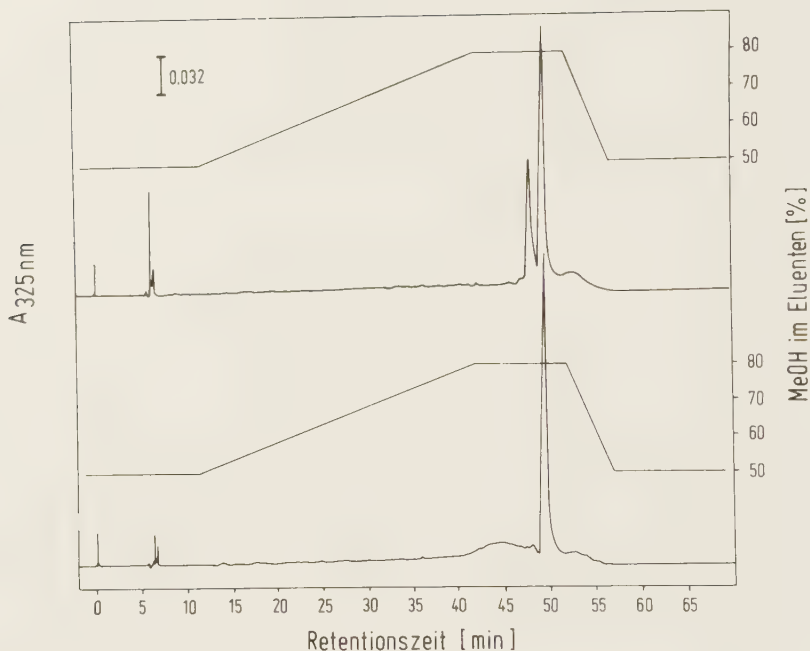


Abb. 38: HPLC-Chromatogramme der cis/trans-Ret-P-Trennung. Injektion: jeweils 25 μ l ethanolische Lösung (0.38 mM Ret-P). Unten: Ret-P, ohne Belichtung. Oben: Ret-P, 1 min belichtet. Bedingungen: Gradienten-HPLC in 5 mM Tetrabutylammoniumphosphat, Detektion bei 325 nm mit einer Empfindlichkeit von Abs=0.32.

Retentionszeit sichtbare* Bestrahlungsprodukt kann deshalb als 13-cis-Ret-P betrachtet werden. Bei längeren Belichtungsdauern, z.B. 5 min waren zwei zusätzliche kleine Peaks zwischen dem Haupt-cis- und dem trans-Gipfel zu erkennen, die möglicherweise 9- und 11-cis-Ret-P repräsentieren.

Die Kinetik der Isomerisierung zu 13-cis aber auch die Abnahme an Gesamtabsorption mit der Belichtungszeit sind in Abb. 39 dargestellt. Der cis-Anteil im photochemischen Gleichgewicht konnte daraus, unter der Annahme eines gleichen molaren Extinktionskoeffizienten für cis und trans, zu 53% bestimmt werden.

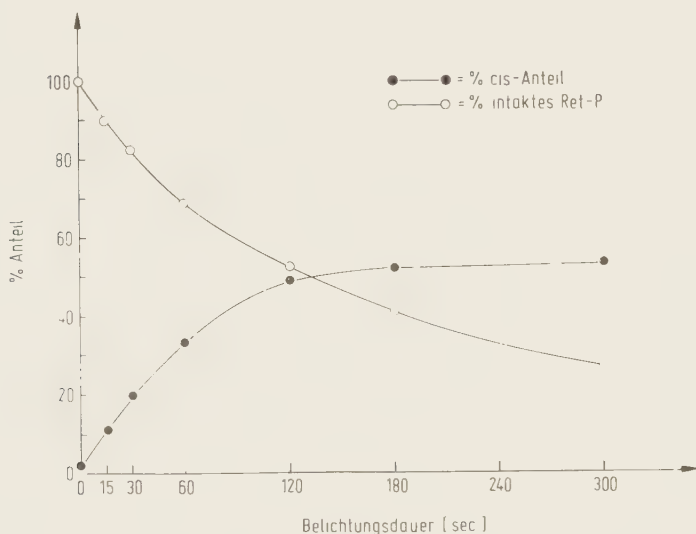


Abb. 39: Kinetik der lichtinduzierten Isomerisierung von Ret-P. Anteile cis/trans und Gesamtabsorption wurden aus den Peakhöhen der Absorption bei 325 nm in HPLC-Chromatogrammen bestimmt.

Zur präparativen Abtrennung von cis- und trans-Ret-P wurde als Kompromiß zwischen möglichst hohem cis-Anteil und möglichst geringer photochemischer Zerstörung eine Belichtungszeit von 45 sec gewählt. Die cis- und trans-Peaks

wurden jeweils direkt nach dem UV-Monitor aufgefangen und gesammelt. Der Gehalt an Ret-P in den gesammelten Eluaten wurde UV-spektrometrisch bestimmt und entsprach mit 38% der Absorption im cis-Pool den Erwartungen. Beide Fraktionen zeigten sich bei der Rechromatographie als einheitliche Peaks, mit Retentionszeiten von 48.3 min für die cis- und 49.8 min für die trans-Verbindung, wobei die Verunreinigung durch das andere Isomere jeweils weniger als 5% ausmachte. Säurekatalysierte Hydrolyse zu Anhydroretinol (siehe 3.4.1) in einem Aliquot diente zur weiteren Überprüfung der Unversehrtheit beider Isomere nach HPLC.

Die Tabelle 11 zeigt das Ergebnis von Ret-P-Man-Synthase-Tests für beide isolierte Isomere. Dabei wurden jeweils 2.5 nMol der Ret-P-Verbindung einer Standardinkubation mit 20 µl solubilisiertem Enzym und 0.05 µCi GDP-Mannose unterworfen.

Tab. 11 : Ret-P-Man-Synthase
für cis- und trans-Ret-P

Ret-P- Isomeres	Ret-P-Man (cpm)
trans	1746
cis	383

Bed.: 2.5 nMol Ret-P, Stan-
dardtest mit ÜS 2% B 58

Die erhaltenen Daten sprechen eindeutig für eine Spezifität der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase bezüglich der cis/trans-Isomerisierung im Ret-P, da die isolierte cis-Verbindung nur 22% der Ret-P-Man-Synthase der trans-Verbindung induzieren kann.

4.3 Trennung beider GDP-Man:Lipid-Phosphat-Mannosyltransferasen und Anreicherungsversuche

4.3.1 Solubilisierte Enzymfraktion

Wie bereits in Teil 4.1.2 erwähnt, wurde für die folgenden Versuche der Überstand nach Solubilisierung der mikrosomalen Membranfraktion in 2% Brij 58 verwendet. Zum Nachweis des

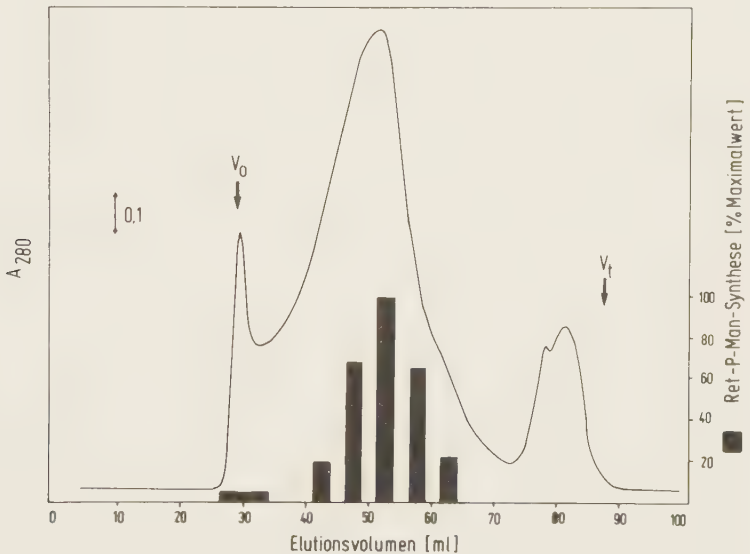


Abb. 40: Gelfiltration an Sepharose CL-6B (1.6x45 cm). Puffer D mit 10 ml/h. Probe: 1 ml ÜS 2% Brij 58 (17.6 mg). V₀ = Ausschlußvolumen (Dextranblau), V_t = Totalvolumen (¹⁴C-Mannose). Schraffierte Balken geben die Rel-P-Man-Aktivität der getesteten Fraktionen wider (Verlauf für Dol-P-Man sehr ähnlich).

solubilisierten Zustands diente erstens eine Rezentrifugation des, als klare, durchsichtige Lösung erscheinenden Solubilisierungsüberstandes, für 2 h bei 150 000 xg, wobei über 90% des Proteins im Überstand verblieb. Gelfiltration an Sepharose CL-6B (Pharmacia, Uppsala) in Detergenspuffer (Puffer D) wurde als zweites Kriterium für Detergenssolubilisierung herangezogen (Springer et al., 1977). Dieses Gelmaterial mit einem weiten Fraktionierungsbereich von 100 bis 4000 kD sollte das gesamte detergensgelöste Protein im Trennvolumen einschließen, d.h. nur membrangebundenes oder stark aggregiertes Material sollte im Ausschlußvolumen einer solchen Säule eluieren. Tatsächlich wurden auch hier über 90% des Proteins, sowie annähernd die gesamte Ret-P-Man/Dol-P-Man-Aktivität im Trennbereich gefunden (Abb. 40).

Unter Standardbedingungen wurden Aktivitäten von 14 300 cpm in 5 min oder 5.9 pMol/min Ret-P-Man-Bildung im Solubilisierungsüberstand gefunden. Dabei gingen knapp über 50% des Proteins und 62% der Gesamt-Ret-P-Man-Synthaseaktivität in Lösung. Diese Werte entsprachen einer spezifischen Aktivität von $17.9 \text{ pMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$, während für die mikrosomale Membranfraktion eine spezifische Aktivität von $16.0 \text{ pMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ bestimmt wurde.

Der Solubilisierungsüberstand nach Zentrifugation war relativ stabil und konnte auf Eis mehrere Tage ohne signifikanten Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Beim Einfrieren dieses Rohextrakts selbst in flüssigem Stickstoff trat jedoch eine Reduktion der Aktivität auf 20-25% in der wiederaufgetauten Fraktion auf. Als großer Vorteil erwies sich die Toleranz der solubilisierten Enzymaktivitäten gegenüber Verdünnungen mit Puffer auch mit Detergens, während für die meisten anderen Detergentien eine deutliche Inhibition der enzymatischen Aktivität in solchen Experimenten beobachtet wurde.

4.3.2 Trennung der beiden Lipid-P-Man-Synthasen durch Polyethylenglykoll-Fällung

Der entscheidende Punkt zur Klärung der Frage nach einer retinolspezifischen Mannosylierung besteht wohl darin, zu zeigen, daß Ret-P-Man und Dol-P-Man von verschiedenen Enzymen synthetisiert werden. Dies wurde durch eine Separierung der beiden Lipid-phosphat-Mannosyltransferasen mit Hilfe von differentiellen Polyethylenglykoll-Fällungen (siehe 3.7.5) erreicht.

Dabei wurde im Solubilisierungsüberstand (2% Brij 58 in Puffer A) mit 25% PEG 6000 eine definierte PEG-Konzentration eingestellt, zentrifugiert und das Pellet auf beide Lipid-P-Man-Synthasen und Proteingehalt analysiert. Der PEG-Gehalt im verbliebenen Überstand wurde in 1% Schritten erhöht und das jeweilige Präzipitat wie vorher untersucht. Da die Ionenstärke einen großen Einfluß auf die Fällungen hatte, wurden Testreihen mit niedriger (15 mM), mittlerer (75 mM) und hoher Ionenstärke (375 mM) durchgeführt.

In der Abb. 41 wird der Fall mittlerer Ionenstärke (d.h. Puffer A) gezeigt. Es ist eine deutliche Trennung der Ret-P-Man-Syntheseaktivität, die ihr Maximum im Pellet mit 6% PEG hatte, von derjenigen der Dol-P-Man-Synthase mit höchster Aktivität in der 4% Fraktion zu erkennen. Die Werte für 3% PEG lagen für beide Enzyme im Vergleich zur 4%-Fraktion sehr niedrig.

Wegen des nichtlinearen Verhaltens der Proteinabhängigkeit für die Dol-P-Man-Synthase (Abb.23), besteht zunächst die Möglichkeit, daß das Ergebnis der PEG-Fällungsreihen einen Artefakt auf Grund dieser Tatsache darstellt. In den Tests zur PEG-Fällung wurden jedoch Proteinkonzentrationen bis zu höchstens 1.1 mg/ml verwendet, während sich der quasi-lineare Bereich in Abb. 23 bis zu 1.7 mg/ml erstreckt. Zudem

erbrachten Kontrollversuche mit der Hälfte der üblicherweise eingesetzten Proteinmenge dieselben Resultate, so daß mit einiger Sicherheit von einer echten Trennung gesprochen werden kann.

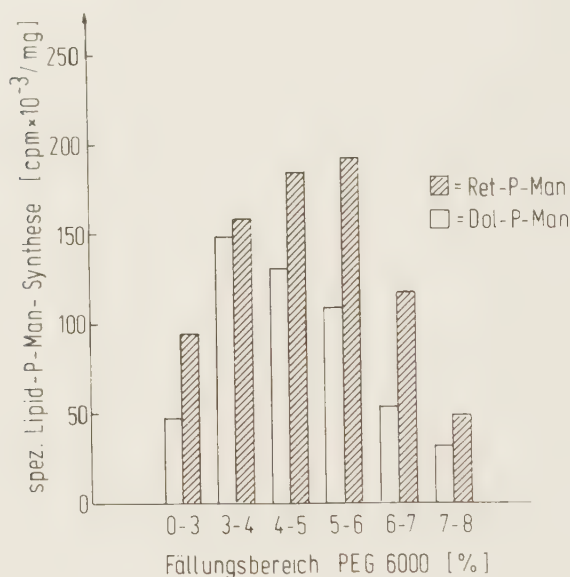


Abb. 41: Trennung beider Lipid-P-Mannosyltransferasen durch differentielle PEG-Fällung. Durchführung siehe 3.7.5 . Jeweils 20 μ l resuspendierter PEG-Niederschlag nach Standardbedingungen getestet.

Eine Trennung der Enzymaktivitäten mit dieser Methode wurde auch bei niedriger Ionenstärke gefunden (Dol-P-Man 1% PEG, Ret-P-Man 3% PEG), nicht jedoch im Fall hoher Ionenstärke, wo anscheinend die Trennleistung nicht mehr ausreichte und beide Aktivitätsgipfel im Pellet nach 8% PEG zusammenfielen.

Durch die differentielle PEG-Fällung wurde als Nebeneffekt eine beachtliche Anreicherung für die Ret-P-Man-Synthase erhalten. Das Pellet nach 6% PEG hatte eine spezifische Aktivität von 248 000 cpm/mg oder $101.7 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, was gegenüber dem 2% Brij 58-Überstand mit $17.9 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ eine Steigerung um den Faktor 5.7 bedeutet.

4.3.3 Anreicherungsversuche für die Ret-P-Man-Synthase

Mit Hilfe üblicher säulenchromatographischer Verfahren wurde versucht, eine Anreicherung und partielle Reinigung der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase in nativer Form zu erreichen.

Hydroxylapatit-Chromatographie

Chromatographie-Läufe an Hydroxylapatit-Ultrogel (LKB, Bromma, Schweden) in 5 mM K-PO_4 -Puffer mit 2% Brij 58 (siehe 3.6.4) zeigten über 50% des Proteins im Ausschlußvolumen der Säule. Ein steiler Gradient von 5 bis 500 mM K-PO_4 /2% Brij 58 ergab einen breiten Proteinpeak (210 mM K-PO_4) mit Hochsalzschulter (350 mM K-PO_4). Der Ausschlußpeak enthielt 26% der aufgetragenen Ret-P-Man-Syntheseaktivität und entsprach bei einer spezifischen Aktivität von $119\,500 \text{ cpm/mg}$ ($49.0 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) einer Anreicherung um den Faktor 2.7. Im Gradienten konnten nur 4% der aufgetragenen Ret-P-Man-Aktivität mit Maximum bei 240 mM K-PO_4 eluiert werden.

Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephacel

Ähnliche Verhältnisse hinsichtlich Ausbeute und Anreicherung ergaben Versuche mit Chromatographie des Überstandes nach Solubilisierung in 2% Brij 58 an DEAE-Sephacel in Puffer C (siehe 3.6.5).

Ungefähr 20% des aufgetragenen Proteins und 16% der Ret-P-Man-Syntheseaktivität wurden nicht gebunden und erschienen in den Ausschlußfraktionen. Der Aktivitätspeak im KCl-Gradienten mit Maximum bei 180 mMol KCl enthielt 32% der ursprünglichen Ret-P-Man-Bildung und hatte eine spezifische Aktivität von 74 000 cpm/mg ($30.3 \text{ pMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$). Kontrollversuche zeigten, daß die Anwesenheit von mehr als 100 mMol Salz die Enzymaktivität stark inhibierte. Tatsächlich wurden nach Dialyse der aktiven Fraktionen mit ca. 180 mMol KCl gegen Puffer A $48.4 \text{ pMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ gefunden, woraus sich eine effektive Anreicherung von 2.7 berechnet.

Um einer eventuellen Inhibierung der enzymatischen Aktivität durch zu hohen Brij-Überschuß vorzubeugen, wurde in einigen Experimenten die Konzentration an Brij 58 im Puffer C auf bis zu 0.1% erniedrigt. Dies hatte jedoch keinen erkennbaren Steigerungseffekt auf die Ret-P-Man-Synthese in den aktiven Fraktionen.

Gelfiltration an Ultrogel AcA 34

Die gesamte Ret-P-Man-Syntheseaktivität eluierte ebenso wie die der Dol-P-Man-Synthase im Ausschlußvolumen einer Ultrogel AcA 34-Säule (LKB, Bromma, Schweden) in 2% Brij 58 (siehe 3.6.3). Da die spezifischen Aktivitäten in reinem Brij-Puffer D nur unwesentlich über denen des Rohextrakts lagen, wurde versucht durch Zusatz von Phospholipid eine Stabilisierung und damit Aktivitätssteigerung der Enzyme zu erreichen.

Dazu wurde eine kaltgesättigte Lösung von Phosphatidylcholin (Sigma II-S) in Puffer D hergestellt, die $2.3 \text{ } \mu\text{Mol P}_i/\text{ml}$ enthielt. Aktivitätstests nach Gelfiltration in diesem Laufpuffer zeigten eine gegenüber dem reinen Brij-Puffer bis zu 8-fach erhöhte Ret-P-Man-Synthese bei etwa gleichbleibender Dol-P-Man-Syntheserate (Abb. 42). Dabei wurden spezifische Aktivitäten von 550 000 cpm Ret-P-Man/mg ($225.5 \text{ pMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) erreicht, also Anreicherungen um das 12 bis 13-fache gegenüber dem Solubilisierungsüberstand. Die leicht

trüben aktiven Ausschlußfraktionen wurden an AcA 34 rechromatographiert, wobei man jetzt im Ausschluß klare Lösungen erhielt, die insgesamt um den Faktor 22 gegenüber dem Überstand nach 2% Brij 58 angereichert waren.

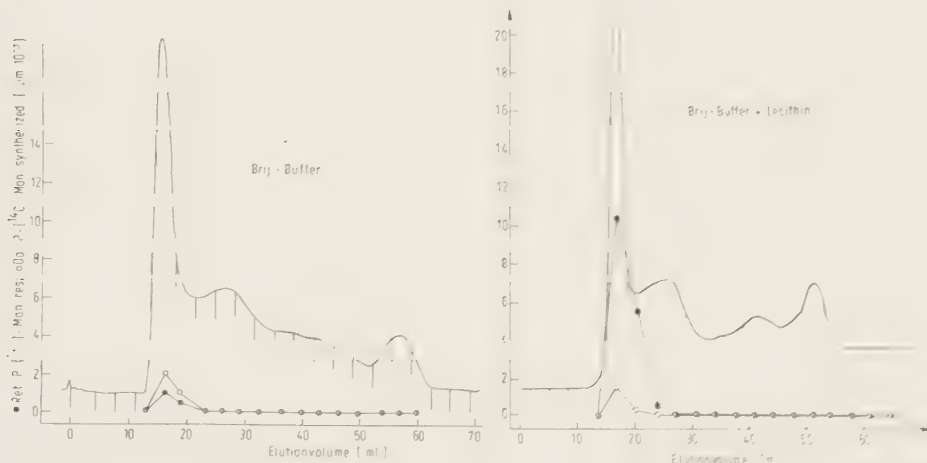


Abb. 42: Gelfiltration des Solubilisierungsüberstands in 2% Brij 58 an Ultrogel AcA 34 (1.6 x 50 cm). Puffer D mit 20 ml/h. Probe: jeweils 1 ml ÜS 2% Brij 58 (17.5 mg Protein). Links: reiner Brij-Puffer; rechts: Brij-Puffer mit Lecithin gesättigt. Ret-P-Man-(●) bzw. Dol-P-Man-(○) Tests wurden unter Standardbedingungen durchgeführt.

Weitere Versuche

Versuche zur Anreicherung durch Chromatographie an hydrophoben Säulenmaterialien wie Octylsepharose und Phenylsepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden) sowie durch Chromatofokussierung an PBE 94 im p_H -Bereich von 4 bis 7 bzw. 6 bis 9

ergaben nur sehr geringe Ret-P-Man/Dol-P-Man-Synthese und damit sogar niedrigere spezifische Aktivitäten als im Rohextrakt.

4.3.4 Aktivierung durch Phospholipid

Nach den Ergebnissen mit gemischtem Phospholipid/Brij-Puffer scheint die Ret-P-Man-Synthase Phospholipid für die Erhaltung des nativen Enzyms und damit einer hohen Aktivität zu benötigen. In einer Reihe von Versuchen zur Aktivierung der Säulenfraktionen nach AcA 34 in reinem Brij-Puffer D mit verschiedenen Phospholipidpräparationen wurde jedoch nur eine Maximalsteigerung auf 203% erreicht.

Die verwendeten Phospholipide waren Phosphatidylcholin aus Sojabohnen und Eigelb (Sigma IV-S bzw. VII-E), Phosphatidylethanolamin aus Eigelb (Sigma III), Phosphatidylinositol aus Sojabohnen, sowie extrahiertes mikrosomales Rattenleber-Gesamtlipid (siehe 3.7.5). Diese Phospholipide wurden sowohl als Lösung in C/M 2:1, die, vom Lösungsmittel befreit, mit den Enzymfraktionen in Brij-Puffer versetzt wurden, als auch als wässrige Lösungen nach Beschallen eingesetzt (siehe 3.7.6).

Die höchste Ret-P-Man-Aktivität (203%) wurde in reinem Phosphatidylcholin (VII-E) bei einem Molverhältnis PC/Brij 58 von 1.4 : 1 gefunden, während alle anderen nur Aktivierungen im Bereich von 112% (PI) bis 176% (endogenes Lipid) der Ausgangsaktivität zeigten.

Da bei der Gelfiltration in PC/Brij 58-Puffer jedoch Steigerungsraten von fast 800% gefunden wurden, folgt daraus, daß die Enzymaktivitäten in reinem Brij-Puffer nach

Gelfiltrationsläufen nur noch teilweise rekonstituiert werden können. Aber selbst durch den Zusatz von Phospholipid direkt zum Laufpuffer können anscheinend nicht alle Faktoren, die zu einer Verringerung der Enzymaktivitäten führen, aufgehoben werden. So ergaben zwei hintereinandergeschaltete Säulenläufe in PC/Brij (z.B. AcA 34 und DEAE-Sephacel) keine weitere Steigerung des Anreicherungsgrades, sondern oftmals spezifische Gesamtaktivitäten, die unterhalb derjenigen für nur einen Chromatographieschritt lagen.

4.4 Mannosetransfer auf endogene Akzeptoren

4.4.1 Vergleich möglicher Mannosendonatoren

Als Mannosendonatoren auf endogene Akzeptoren kommen in der Rattenleber außer Ret-P-Man noch Dol-P-Man und der aktivierte Nucleotidzucker GDP-Man in Frage (siehe 2.1.4).

Ret-P-(^{14}C)Man wurde in halbpräparativem Maßstab enzymatisch synthetisiert und gereinigt (siehe 3.4.4). Im Standard-Mannosetransfer-Test (siehe 3.5.2) wurde dann Ret-P-(^{14}C)Man, ebenso wie Dol-P-(^{14}C)Man und GDP-(^{14}C)Man auf ihre Fähigkeit überprüft, Mannose kovalent in mikrosomale Proteine einzubauen. Dazu wurde nach Inkubation der ^{14}C -markierten Donatoren mit Mikrosomen und Stoppen der Reaktion mit C/M 2:1 durch selektive Extraktion fraktioniert.

Tab. 12 : Mannosetransferaktivität verschiedener Mannosendonatoren.

Donator	C/M 2:1	H ₂ O	C/M/H 10:10:3	Proteinpellet
GDP-Man	38 %	57 %	0.5 %	3.8 %
Dol-P-Man	97 %	0.1%	2.5 %	0.3 %
Ret-P-Man	56 %	31 %	1.0 %	12.7 %

Alle Werte in % der eingesetzten cpm

Bedingungen: Je 30 000 cpm Man-Donator, Standard-Mannosetransfer-Test, 27 °C, 30 min. . Spalte 1 (C/M 2:1) enthält Lipid-P-Monosaccharid, Spalte 2 (H₂O) freie Mannose, Man-P oder GDP-Man, Spalte 3 (C/M/H 10:10:3) Oligosaccharid-Lipid und Spalte 4 (Pellet in SDS-Extraktionspuffer) proteingebundene Mannose.

Tab. 12 zeigt, daß die höchste Mannosylierungsrate der Proteinfraction mit Ret-P-Man erhalten wurde. Signifikanter Mannosetransfer, wenn auch nur mit 30% Effizienz wurde auch noch mit GDP-Man beobachtet, wohingegen Dol-P-Man nur eine sehr geringe Einbaurrate unter diesen Bedingungen erreichte.

Dagegen war die aus Dol-P-Man stammende Radioaktivität in der C/M/H 10:10:3-Fraktion, die extrahiertes lipid-gebundenes Oligosaccharid enthält, am höchsten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der postulierten Rolle des Dol-P-Man als Überträger der Mannosen 6 bis 9 auf das wachsende Dol-PP-gebundene Oligosaccharid im Dolichylphosphatzzyklus der N-Glycosylierung (Abb. 2). Der geringe Anteil von (^{14}C)Mannose aus Ret-P-Man in dieser Fraktion, verglichen mit dem Proteinpellet, deutet auf einen direkten Transfer von Mannose auf endogene Proteinakzeptoren ohne Oligosaccharidlipid-Zwischenstufen hin. Für die Mannosylierung über Ret-P-Man muß also ein, von der Dol-P-Man-Mannosylierung unabhängiger, anderer Reaktionsweg postuliert werden.

4.4.2 Subzelluläre Verteilung der Ret-P-Man:Protein-Mannosyltransferaktivität

Die schon in Kapitel 4.1.4 beschriebenen Rattenleberfraktionen von Prof. S. Fleischer wurden verwendet, um die subzelluläre Verteilung der Transferaktivität auf endogenes Protein zu überprüfen. Abb. 43 zeigt die Ergebnisse dieser Tests zusammen mit denjenigen, die für die Ret-P-Man-Syntheseaktivität erhalten wurden.

Für die Mannosetransfer-Reaktion über Ret-P-Man erhielt man, verglichen mit der Ret-P-Man-Synthese, eine völlig andere Verteilung, mit einer sehr hohen Aktivität des (^{14}C)Mannoseeinbaus in Proteine des Golgi-Apparates und relativ geringer Markierung im RER, während für die Ret-P-Man-Synthase die

Aktivität im RER sehr hoch und im Golgi vernachlässigbar klein war. Bei Inkubationen mit Golgi-Fractionen unter Standardbedingungen wurden dabei bis zu 21% der Radioaktivität von Ret-P-(^{14}C)Man transferiert.

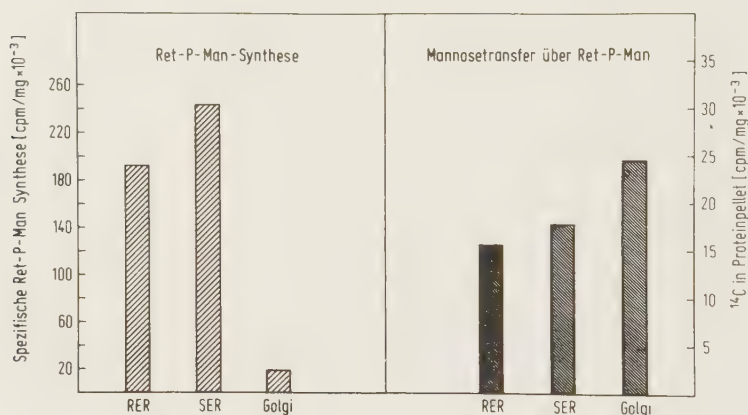


Abb. 43: Subzelluläre Verteilung von Mannosyltransferaktivitäten. Links: Synthese von Ret-P-Man aus Ret-P und GDP-Man. Rechts: Mannosetransfer von Ret-P-Man auf endogene Proteine. Jeweils Standardbedingungen.

Damit scheinen die beiden enzymatischen Reaktionen, die für eine Mannosylierung von Proteinen über Ret-P als Mannoseüberträger nötig sind, räumlich getrennt zu sein. Ret-P-Man wurde hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, während der Hauptort der Verwendung dieses Intermediats zur Glycoproteinsynthese offensichtlich im Golgiapparat liegt. Die Mannosetransferaktivität über Ret-P-Man scheint daher ein relativ spätes Ereignis auf dem biosynthetischen Reaktionsweg von Proteinen darzustellen. Dies weist auf eine

Beteiligung von Ret-P-Man an den komplizierten, noch nicht voll verstandenen, posttranslationalen Glycosylierungsreaktionen, wie der Synthese von O-Glycosiden oder terminaler Glycosylierung von N-glycosidischen Oligosacchariden hin, die alle im Golgiapparat stattfinden (Hanover et al., 1980)

4.4.3 Charakterisierung der Ret-P-Man:Protein-Mannosyltransferaseaktivität

a) Kinetik

Mannosetransfer-Tests wurden unter Standardbedingungen mit 30 000 cpm Ret-P-(^{14}C)Man für verschiedene Inkubationszeiten durchgeführt. Abb. 44 zeigt eine typische Sättigungskinetik, mit linearer Zeitabhängigkeit des Einbaus in Protein bis ca. 5 min und einem Maximum bei 30 min, gefolgt von einem leicht abfallenden Plateau bis 60 min.

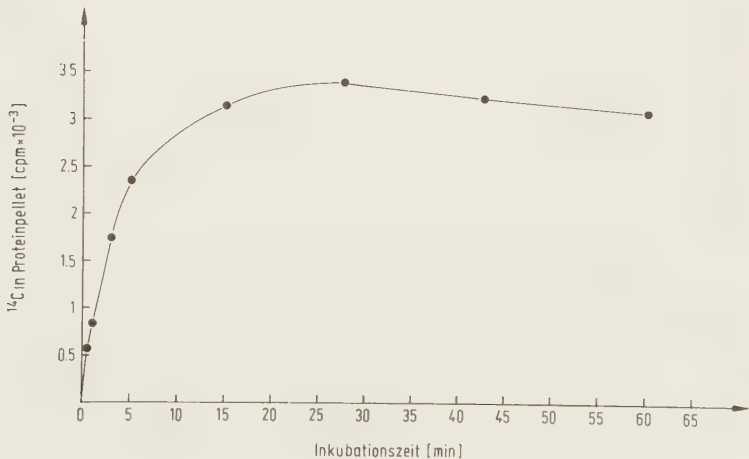


Abb. 44: Kinetik des Mannosetransfers auf endogene Proteinakzeptoren (Standardbed., 30 000 cpm Ret-P-(^{14}C)Man).

b) Proteinabhängigkeit

Unter den gewählten Testbedingungen wurde eine Sättigung bereits mit einer Proteinkonzentration von 2.5 mg/ml erreicht (Abb. 45). Bei Inkubationszeiten von 30 min und 30 000 cpm Ret-P-Man scheint schon diese Proteinkonzentration die maximal erreichbare Mannosylierungsrate zu verwirklichen. Diese Maximalrate betrug bei Erreichen des Plateaus in Abb. 45 (3.0 mg Protein/ml) 67 000 cpm/mg oder 137 pMol (^{14}C)Mannose/mg. Da eine Steigerung der Proteinkonzentration, d.h. eine Erhöhung des Angebots an Akzeptoren, keine weitere Erhöhung des Einbaus ergab, andererseits vermehrte Substratzugabe die Mannosetransferaktivität noch steigerte (siehe Abb. 46 A), muß man wohl davon ausgehen, daß dieses Sättigungsverhalten in der Hydrolyse des labilen Substrats begründet ist.

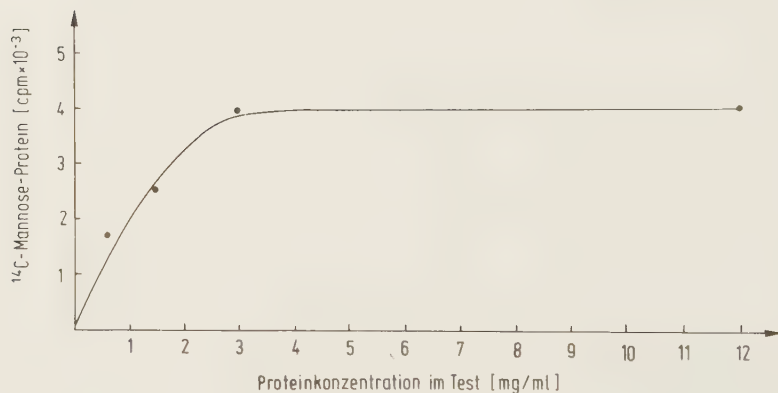


Abb. 45: Proteinabhängigkeit des Mannosetransfers über Ret-P-Man. Bed.: Standardtests, 30 min., 30 000 cpm Ret-P-(^{14}C)Man.

c) Substratabhängigkeit

Standard-Mannosetransfer-Tests wurden mit steigenden Konzentrationen an Ret-P-Man durchgeführt. Dabei zeigte sich ein linearer Verlauf der Substratabhängigkeit bis 300 000 cpm Ret-P-Man (10-fache Menge des Standardtests), bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml (Abb. 46 A). Durch Erniedrigung der Proteinkonzentration im Testansatz auf 2.5 mg/ml konnte das, für eine enzymatische Reaktion erwartete, Sättigungsverhalten beobachtet werden (Abb. 46 B). Das Plateau entsprach in diesem Fall einem Einbau von 65 000 cpm/mg oder 131 pMol (^{14}C)Mannose/mg, ein Wert der sehr gut mit der maximalen Einbaurate von 137 pMol/mg, die aus der Proteinabhängigkeit bei konstanter Substratkonzentration (Abb. 45) erhalten wurde, korreliert.

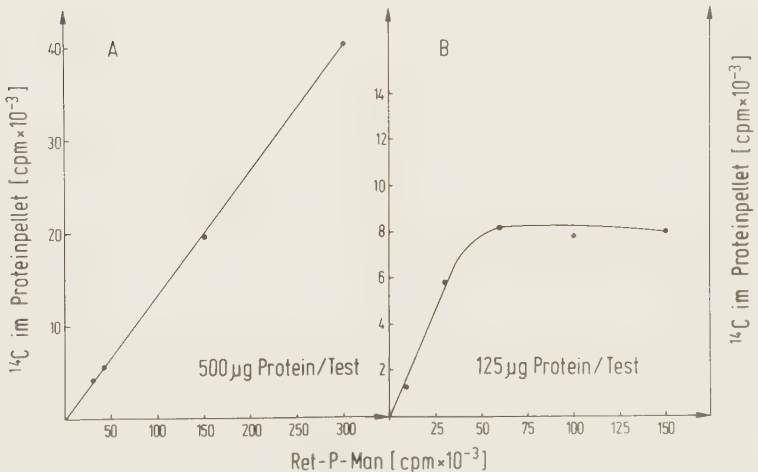


Abb. 46: Substratabhängigkeit des Mannosetransfers über Ret-P-Man. Standardbedingungen. Teil A: Proteinkonz. 10 mg/ml, Teil B: Proteinkonz. 2.5 mg/ml.

3) Tritonabhängigkeit

Tab. 13 zeigt die Mannosetransferaktivitäten, die mit und ohne TX-100 an Golgi-Vesikeln gemessen wurden.

Tab. 13: Triton-Abhängigkeit des
Mannosetransfers

Konz. TX-100	cpm im Protein
--	949
0.25 %	2 570
0.50 %	2 898

Die Zugabe von TX-100 konnte also den Mannosetransfer bis zu einem Faktor von 3 steigern. Diese Triton-Aktivierung könnte auf die größere Hydrophobizität von Ret-P-Man gegenüber Ret-P (eine negative Ladung am Phosphat gegenüber zwei Ladungen in Ret-P) und der damit einhergehenden geringeren Löslichkeit zurückzuführen sein, die durch Zugabe des Detergens kompensiert werden muß.

Der zweite wichtige Effekt liegt wahrscheinlich in der Öffnung der Golgi-Vesikel durch TX-100. Die Sensitivität der Golgi-Vesikel gegenüber osmotischen Verhältnissen, aber auch gegenüber anderen Beanspruchungen, wie sie das Einfrieren und Wiederauftauen darstellen, wird in der Literatur immer wieder betont (z.B. Carey & Hirschberg, 1981). Aus diesem Grund wurde die Intaktheit der verwendeten Golgi-Vesikel jeweils durch Tests der Dinucleotid-diphosphatase (siehe 3.8.3) geprüft, von der bekannt ist, daß sie im Lumen des Golgi-Apparates und damit im Innern der Vesikel, die zum allergrößten Teil "right side out" vorliegen, lokalisiert ist (Brandan & Fleischer, 1982). Mit IDP als Substrat ergaben sich dabei Werte von $0.32 \mu\text{Mol P}_i \text{min}^{-1} \text{xmg}^{-1}$ bei

Abwesenheit von Triton (geschlossene Vesikel) und von $1.3 \mu\text{Mol } P_i \text{ x min}^{-1} \text{ x mg}^{-1}$ mit 0.05% TX-100 (geöffnete Vesikel). Diese entsprachen exakt den von Brandan & Fleischer (1982) gefundenen P_i -Bildungsraten für die besten Golgi-Präparationen, womit die Unversehrtheit der hier verwendeten Golgi-Vesikel nachgewiesen wurde.

Die mit der Triton-Zugabe einhergehende Öffnung der Vesikelmembranen, ablesbar an der 4-fach erhöhten Zugänglichkeit der Dinucleotid-diphosphatase, läuft also weitgehend der Aktivierung des Mannosetransfers durch TX-100 parallel. Im physiologischen Fall liegt Ret-P-Man jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit direkt in die Membran integriert vor, so daß sich die Ergebnisse dieser in vitro-Experimente, bei denen Ret-P-Man von außen angeboten wird und erst in die Membran aufgenommen werden muß, nicht unbedingt auf in vivo-Verhältnisse übertragen lassen. Das Ausmaß der Integration des Substrates in die Membran hängt im in vitro-Fall entscheidend von seiner Konzentration im Inkubationsansatz und damit von seiner Löslichkeit ab. Diese wird mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Bildung von Ret-P-Man/TX-100-Micellen erhöht.

4.4.4 Charakterisierung der endogenem (^{14}C)Mannose-Akzeptoren

Natur der endogenen Akzeptoren

Die kovalente Natur der Bindung der transferierten (^{14}C)Mannose an endogene Akzeptoren wurde durch Inkubation des Pellets nach differentieller Extraktion mit Lösungen von 1 mM Mannose und 1 mM Mannosephosphat für mehrere Tage belegt. Dabei gingen nur 5-10% der Radioaktivität in den Überstand, der größte Teil der Markierung ließ sich also nicht durch die eventuell auftretenden Ret-P-Man-Spaltprodukte verdrängen.

Gelfiltration an Sephadex G 25 (Pharmacia, Uppsala), wo die gesamte Radioaktivität im Ausschluß eluierte, zeigte zudem die hochmolekulare Struktur der Akzeptoren.

Typ der Oligosaccharid-Proteinbindung

Einer der interessantesten Aspekte der Ret-P-Man-vermittelten Mannosylierung von Golgi-Proteinen ist die Klärung der Frage nach der Natur der Bindung zwischen den über Ret-P-Man markierten Oligosacchariden und der Polypeptidkette im Glycoprotein.

Die beiden Haupttypen von Bindungen, nämlich O-glycosidisch an Hydroxylgruppen von Serin und Threonin oder N-glycosidisch an Asparagin, lassen sich experimentell auf Grund ihrer unterschiedlichen Reaktivität gegenüber Alkali unterscheiden (Spiro, 1972). Milde alkalische Behandlung spaltet O-glycosidische Oligosaccharide durch β -Elimination vom Protein ab, während N-Glycoside unter diesen Bedingungen stabil bleiben.

Der Anteil O-glycosidisch gebundener Radioaktivität wurde im solubilisierten Proteinpellet nach Mannosetransfer-Tests durch Behandlung mit 0.1 N NaOH bestimmt (siehe 3.7.8). Dabei konnten über 85% der ^{14}C -Markierung als O-glycosidisch gebunden nachgewiesen werden.

Dieser Befund bestätigt die, aus der subzellulären Verteilung vermutete, Golgi-spezifische Mannosylierung über Ret-P-Man, da Synthese von O-glycosidischen Oligosacchariden bis jetzt ausschließlich im Golgiapparat gefunden worden ist.

5. DISKUSSION

Dol-P-unabhängige Ret-P-Man-Synthese

Der Einfluß von Retinol auf die Glycoprotein-Synthese wird von mehreren Arbeitsgruppen intensiv untersucht. Die Ergebnisse besonders aus den Labors von DeLuca und Wolf haben in den letzten Jahren viele Hinweise auf eine direkte und spezifische Beteiligung des Retinols als Retinyl-phospho-mannose-Intermediat am Aufbau von proteingebundenen Oligosaccharidketten gegeben. Diese Evidenzen, die in der Einleitung (2.3.2) bereits aufgeführt wurden, resultierten aus Untersuchungen der betreffenden Glycosyltransferasen aus Lebermikrosomen in membrangebundener Form. Wegen der, in den Mikrosomen ebenfalls vorkommenden, besser untersuchten Dol-P-Man-Synthase, waren diese jedoch nur indirekter Natur, da ein Artefakt auf Grund einer unspezifischen Seitenreaktion des Dol-P-abhängigen Enzyms nicht ausgeschlossen werden konnte.

Um zu direkteren Aussagen über eine physiologische Bedeutung der beobachteten enzymatischen Reaktion zu gelangen, erschien es deshalb notwendig, die GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase-Aktivität in möglichst stabiler solubilisierter Form zu erhalten und von der entsprechenden Dol-P-abhängigen Enzymaktivität abzutrennen.

Ein von Shidoji et al. (1981) beschriebener Filtertest für die Ret-P-Man-Bildung, der auf der Bindungsfähigkeit des durch (^{14}C)Mannose markierten Retinyl-P-Restes an die auf dem Filter zurückgehaltene Membran beruht, läßt sich auf einen löslichen Detergensextrakt nicht anwenden. Die zweite Alternative, Abtrennung des Ret-P-Man mit Dünnschichtchroma-

tographie, erwies sich als zu unsicher und langwierig, so daß ein neuer enzymatischer Test basierend auf Reversed phase-HPLC entwickelt wurde.

Die im nichtionischen Detergens Brij 58 solubilisierten Lipid-P-Mannosyltransferasen zeigten bei vergleichender Charakterisierung im wesentlichen noch dieselben Eigenschaften, wie sie für die membrangebundene Form publiziert wurden. Die indirekten Hinweise auf das Vorhandensein zweier GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferasen aus der Literatur, konnten also auch mit dem solubilisierten Enzym bestätigt werden. Dies betrifft zum Beispiel die Kinetik der Produktbildung (Shidoji et al., 1982) und die Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Shidoji et al., 1981), sowie von der Lipid-P- bzw. der GDP-Man-Konzentration (Shidoji & DeLuca, 1981). An der mikrosomalen Membranfraktion wurde ein K_M -Wert gegenüber GDP-Man von $18 \mu\text{M}$ gefunden, der gut mit dem in dieser Arbeit am solubilisierten Enzym bestimmten Wert von $15.6 \mu\text{M}$ korreliert. Aus solchen Übereinstimmungen kann gefolgert werden, daß sich die Eigenschaften der untersuchten enzymatischen Aktivität durch die Solubilisierung nur geringfügig ändern, das Protein also relativ ungestört in seiner nativen Form vorliegen sollte.

Ein weiteres Argument für die Unterscheidbarkeit einer Ret-P-abhängigen und Dol-P-abhängigen Mannosyltransferase lieferte die Abhängigkeit der Aktivitäten von Me^{2+} -Kationen. Die viel bessere Wirksamkeit des Mn^{2+} -Ions im Vergleich zu anderen Me^{2+} (z.B. Mg^{2+}) bei der Stimulation der Ret-P-Man-, jedoch nicht der Dol-P-Man-Synthese (Abb. 24) wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Außerdem zeigte die Ret-P-Man-Syntheseaktivität im Gegensatz zum Dol-P-Man-Fall einen absoluten Bedarf an diesen zweiwertigen Kationen.

Unterschiede zu Literaturdaten wurden bezüglich des Verhaltens gegenüber dem Aktivator BSA gefunden. Die in 2% Brij 58 solubilisierete Ret-P-Man-synthetisierende Aktivität zeigte,

ebenso wie die membrangebundene Form, starke Stimulation (Abb. 17), während mit dem von Shidoji et al. (1981) verwendeten TX-100-Extrakt keinerlei BSA-Aktivierung zu erkennen war.

Stärkere Evidenzen wurden in Versuchen mit den chemisch synthetisierten ^{32}P -markierten Substraten gefunden. Hier zeigte sich, daß in einer nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese durch Ret- ^{32}P und Dol- ^{32}P unterschiedliche Banden markiert wurden (Abb. 33). Diese Tatsache läßt sich nur schwer mit dem Argument vereinbaren, die Ret-P-Man-Bildung sei nur eine Seitenreaktion der Dol-P-Man-Synthase bei Überschuß von Ret-P.

In dieselbe Richtung wiesen die Ergebnisse der Kompetitions-experimente (4.1.8). Diese zeigten, daß selbst sättigende Konzentrationen an Dol-P die Ret-P-Man-Synthase nur in sehr geringem Umfang (maximal 25%) inhibieren. Wegen der 10-fach höheren Substrataffinität der Dol-P-Man-synthetisierenden Enzymaktivität sollte jedoch, bei Vorliegen einer Kompetition der beiden Substrate um ein Enzym die Inhibition der Ret-P-Man-Synthase sehr viel höher sein. Dies schließt eine Kompetition von Dol-P und Ret-P um die Ret-P-Man-Syntheseaktivität aus. Umgekehrt hatten sättigende Ret-P-Konzentrationen keinerlei Einfluß auf die Substratabhängigkeit der Dol-P-Man-Synthesegeschwindigkeit (Abb. 37). Damit findet auch keine Kompetition von Ret-P und Dol-P um die Dol-P-Man-synthetisierende Aktivität statt, das heißt, beide Ergebnisse sprechen für zwei unabhängig voneinander wirkende Enzymaktivitäten.

Eine Trennung der beiden GDP-Man:Lipid-P-Mannosyltransferaseaktivitäten kann wohl als der deutlichste Beweis für die Existenz einer Dol-P-unabhängigen Ret-P-Man-Synthase angesehen werden. Die Separierung beider Enzymaktivitäten gelang durch differentielle Polyethylenglykoll-Fällung (Abb. 41), wobei die erreichte Abtrennung zwar gut erkennbar,

jedoch nicht vollständig war. Inwieweit das teilweise Überlappen der Enzymaktivitäten auf eine noch ungenügende Trennleistung des Systems zurückgeht oder aber eine teilweise Kreuzreaktion der Enzyme widerspiegelt, kann erst mit den bis zur Homogenität gereinigten Proteinen beantwortet werden, die jedoch derzeit noch nicht zur Verfügung stehen.

Die Summe dieser Resultate erlaubt wohl den Schluß, daß der Nachweis der Ret-P-Man-Bildung über eine spezifische, vom Dol-P-Zyklus unabhängige Mannosyltransferase, zumindest für Leberzellen, erbracht wurde.

Spezifität der GDP-Man:Ret-P-Mannosyltransferase

Diese Mannosyltransferase, die das zentrale Enzym für den Retinolweg der Glycosylierung darstellt, zeigte eine recht hohe Spezifität sowohl gegenüber Nucleotidzuckern, als auch gegenüber phosphorylierten Retinoidderivaten. Bezüglich des aktivierten Zuckers wurde sogar eine absolute Spezifität für GDP-Mannose gefunden. Da andere Nucleotidzucker von Ret-P nicht akzeptiert wurden und damit Störungen von eventuellen anderen Ret-P-abhängigen Glycosyltransferasen ausgeschlossen sind, wird im folgenden nur noch von Mannosylierungsreaktionen gesprochen.

Zur Frage der Akzeptorfähigkeit verschiedenster Retinoid-phosphat-Derivate für Mannose existieren eine ganze Reihe von Arbeiten. Der Einfluß der einzelnen Strukturelemente des Retinols auf seine Aktivität als Substrat der Ret-P-Man-Synthase läßt sich nach diesen und eigenen Ergebnissen in die Reihenfolge:

Endgruppe > konjugierte Seitenkette > Cyclohexen-Ring

einordnen. Modifikationen im Cyclohexen-Ring scheinen nur sehr geringe Auswirkungen auf die Umsetzung der phospor-

lierten Verbindung mit GDP-Man zu haben. Als Beispiele dazu können das 5,6-Epoxy-Retinyolphosphat, mit sogar leicht erhöhter Aktivität (Bhat et al.,1981) und das 1,2,5-Trime-thyl-4-Methoxy-phenyl-Retinyolphosphat (DeLuca et al.,1977), mit 83% Aktivität der Retinyolphosphat-Kontrolle, dienen. Ein weitaus größerer Effekt wurde in der hier vorgelegten Arbeit für Variationen in der konjugierten Seitenkette mit 43% Aktivität für "Phenylretinyolphosphat" (Phenylring zwischen C₉ und C₁₂ in der Seitenkette integriert) und nur 22% Aktivität für 13-cis-Ret-P beobachtet. Die Phosphatestergruppe stellt jedoch den wichtigsten Teil des Moleküls für die Verwendung als Substrat der Ret-P-Man-Synthase dar, da zum Beispiel das gemischte Anhydrid aus Retinsäure und Phosphat (Frot-Coutaz et al.,1976) keine Akzeptorfähigkeit für Mannose aus GDP-Man mehr aufweist.

Die einzige mir bekannte Verbindung, die nicht in die oben aufgestellte Abfolge hineinzupassen scheint, ist das in der Seitenkette perhydrierte Retinyolphosphat-Derivat (DeLuca et al.,1977). Dieses zeigt nach Literaturdaten noch 83% der Vergleichsaktivität, was einer wichtigen Rolle der konjugierten Seitenkette bei der Substrat-Enzym-Erkennung zu widersprechen scheint. Es wäre allerdings möglich, daß eine solche weitgehend gesättigte Verbindung, die einer, wenn auch verkürzten, Dolicholstruktur schon recht nahe kommt, von der noch anwesenden Dol-P-Man-Synthase als Substrat erkannt wird. Ein Hinweis darauf ist die starke Hemmung der Dol-P-Man-Bildung aus endogenem Dol-P durch dieses Derivat.

Ret-P-Synthase

Bis jetzt wurden Aspekte der Gleichung (2) des Reaktionsschemas auf Seite 26 (Bildung von Ret-P-Man aus Ret-P und GDP-Man) diskutiert. Die vorhergehende Reaktion, nämlich die Phosphorylierung des Retinols zum Retinyolphosphat wurden, was die Natur des Phosphatdonors und die Charakterisierung

der Kinase betrifft, noch nicht näher untersucht. Jedoch zeigte die enzymatische Synthese von Ret-P-Man ohne Anwesenheit von exogen zugesetztem Ret-P zumindest, daß endogenes Ret-P in der mikrosomalen Rattenlebermembran vorhanden sein muß. Die gefundene Ret-P-Menge lag dabei in derselben Größenordnung wie endogenes Dol-P und entsprach immerhin 4% der in der Literatur angegebenen Retinolkonzentration in Mikrosomen (Nyquist et al., 1971).

Mannosetransfer

Der dritte Reaktionsschritt, der eigentliche Transfer der Ret-P-gebundenen Mannose auf endogene Proteinakzeptoren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersucht. Ausgehend von einer Arbeit von Rosso et al. (1977), die eine Mannoseübertragung von Ret-P-Man auf mikrosomales Protein nachweisen konnten, wurde die Aktivität des Mannosetransfers näher charakterisiert. Dies war auch im Hinblick auf eine neuere Arbeit aus dem Labor von George Wolf (Quill & Wolf, 1981) interessant, in der ein enzymatischer Mannosetransfer über Ret-P-Man in Abrede gestellt wird. Wolf fand keinen Mannoseeinbau bei Inkubation von Ret-P-Man mit mikrosomalen Akzeptoren, der über eine Kontrolle mit hitzedenaturierten Mikrosomen hinausging. Allerdings betrugen die in dieser Publikation berichteten Transferraten nur 1.5% der eingesetzten Ret-P-Man-Menge, während die hier vorgestellten Ergebnisse einen Mannoseeinbau von bis zu 20% des angebotenen Substrates repräsentieren. Der Wert von 1.5% entspricht aber interessanterweise ungefähr den 300-500 cpm, die hier nach Vorbehandlung der Mikrosomen für 10 min bei 95 °C im Proteinpellet nach dem Mannosetransfertest gefunden wurden.

Im Verlauf der Experimente mit enzymatisch synthetisiertem und säulenchromatographisch gereinigtem Ret-P-Man wurden gelegentlich Ret-P-Man-Präparationen erhalten, die ähnlich schlechte Transferaktivitäten zeigten, wie sie von Quill &

Wolf berichtet werden. Solche Ret-P-Man-Ansätze wiesen allerdings auch bei der Analyse auf Dünnschichtplatten mehr Verunreinigungen als üblich auf. Diese Beobachtungen könnten den Schluß nahelegen, daß die Anwesenheit von Zersetzungsprodukten des labilen Substrats Ret-P-Man, die eventuell als Inhibitoren wirken könnten, den Hauptgrund für niedrigen Mannosetransfer darstellt.

Mit Ret-P-Man, das nach DC-Kriterien nur unwesentlich verunreinigt war, konnte eine Transferreaktion der Mannose auf endogene Akzeptoren nachgewiesen werden, die sich als enzymatische Reaktion charakterisieren ließ. Darauf deuten sowohl die typische Sättigungskinetik (Abb. 44), aber auch die Proteinabhängigkeit (Abb. 45) und besonders die Substratabhängigkeit der Reaktion hin. Das Auftreten einer Substratsättigung bei relativ niedriger Proteinkonzentration und damit limitierter Zahl der Akzeptoren (Abb. 46 B), läßt sich kaum mit einer nichtenzymatischen, unspezifischen Reaktion vereinbaren.

Subzelluläre Fraktionen

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der einzelnen Teilschritte für die Ret-P-abhängige Mannosetransferreaktion erwiesen sich als besonders interessant. Die höchste Aktivität der Ret-P-Man-Synthase wurde dabei in den beiden Fraktionen des endoplasmatischen Retikulums (RER und SER) gefunden, während alle anderen subzellulären Fraktionen keine, über den Prozentsatz der ER-Kontaminationen hinausgehende, Aktivität aufwiesen. Dies trifft insbesondere für den Golgi-Apparat zu, der einen Bestandteil der mikrosomalen Membranen darstellt, mit denen der größte Teil der Experimente dieser Dissertation durchgeführt wurde.

Die Rolle des SER, das noch eine etwas höhere Ret-P-Man-Synthaseaktivität als das RER aufwies, ist dabei schwierig

abzuschätzen, da über die eigentliche Funktion dieser Organelle kaum gesicherte Erkenntnisse vorliegen. Die frühe Hypothese, die dem SER eine reine Vorstufenrolle für die Biogenese des RER durch Bindung freier Ribosomen zuschrieb (Fawcett, 1955), ließ sich auf Grund weitergehender morphologischer Unterschiede nicht halten. Aus dem Vorkommen besonders großer Mengen SER in spezialisierten Zellen, wie Fettdrüsenzellen (Palay, 1958) oder Zellen von Hoden und Ovarien (Christensen & Fawcett, 1961) wurde auf eine Funktion im Lipid-Metabolismus bzw. der Biosynthese von Steroidhormonen geschlossen. Seit jedoch Methoden zur Subfraktionierung von Mikrosomen in glattes und rauhes ER bekannt sind (Dallner & Ernster, 1968), sind diese Interpretationen in Frage gestellt, denn es zeigte sich, daß sich die biochemischen Eigenschaften der beiden Fraktionen, abgesehen vom Ribonucleoprotein-Gehalt, so gut wie nicht voneinander unterscheiden. Bis heute ist noch kein Markerenzym bekannt, das nur in einer der beiden Fraktionen lokalisiert wäre (Fawcett, 1981).

Allerdings scheint festzustehen, daß im Fall der Leberzellen das glatte ER auch in räumlicher Hinsicht eine Art Zwischenstellung zwischen rauhem ER und Golgi-Apparat einnimmt, wobei aus elektronenmikroskopischen Daten eine größere Nähe zum rauhen ER ersichtlich ist. Oft findet man sogar Verbindungen zwischen rauhem und glattem ER, die den Anschein eines direkten Übergangs zwischen beiden Fraktionen erwecken.

Die Diskrepanz der Daten der subzellulären Lokalisation zu Literaturwerten und mögliche Erklärungen wurden bereits im Ergebnisteil (4.1.4) ausführlich abgehandelt. Eine erst vor sehr kurzer Zeit erschienene Arbeit (Creek et al., 1983) bestätigt dagegen die Nichtbeteiligung des Golgi-Apparates an der Ret-P-Man-Synthese. Dort wurden 16% der Ret-P-Man-Syntheseaktivität des ER im Golgi-Apparat gefunden, bei einer Kontamination der Golgi-Präparation mit ER-Marker von

14%. Die Autoren verwendeten jedoch eine Gesamt-ER-Fraktion, das heißt ohne Trennung in rauhes und glattes ER, so daß keine Aussagen über das Verhältnis dieser beiden Fraktionen getroffen wurden.

Die Aktivität des Mannosetransfers vom Intermediat Ret-P-Man auf endogene Akzeptoren in subzellulären Fraktionen zeigte eine von der Ret-P-Man-Synthese verschiedene Verteilung. Hier hatte der Golgi-Apparat sogar die höchste Aktivität, während diejenige des RER relativ gering war. In der schon erwähnten Arbeit von Creek et al. (1983), der einzigen in der die subzelluläre Lokalisation des Mannosetransfers untersucht wurde, kommen die Autoren zu dem abweichenden Schluß, daß Mannosylierung nur im ER, nicht jedoch im Golgi-Apparat stattfinden kann. In diesen Experimenten wurde jedoch die Mannoseübertragung nach Inkubation mit GDP-Man und Ret-P, das heißt ohne Separierung der beiden beteiligten Teilreaktionen, analysiert. Da im Golgi-Apparat fast kein Ret-P-Man synthetisiert wird, hatten Creek et al. keine Möglichkeit, die hier mit Golgi-Fraktionen gefundene höchste Mannosylierungsaktivität, nach Inkubation mit dem Intermediat Ret-P-Man, ebenfalls zu detektieren.

Modell der Retinol-Beteiligung an der Glycoprotein-Synthese

Ret-P-Man-Bildung und seine Verwendung als Mannoseüberträger scheinen also räumlich getrennt zu sein. Während Ret-P-Man im ER gebildet wurde, lag die Hauptaktivität des Transfers der Lipidphosphat-gebundenen Mannose im Golgi-Apparat, stellt also ein relativ spätes Ereignis in der Glycoprotein-Biosynthese dar. Aus dem zusätzlichen Befund, daß die überwiegende Menge der eingebauten Mannose O-glycosidisch gebunden war, kann ein Modell der Beteiligung des Retinols an der Glycoprotein-Biosynthese abgeleitet werden, das die hier berichteten Ergebnisse zusammenfaßt (Abb. 47).

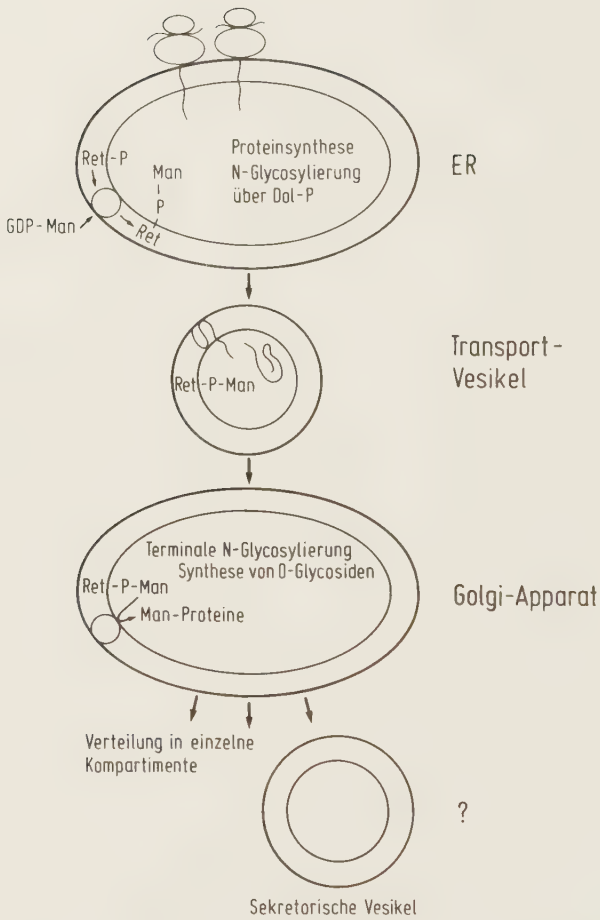


Abb. 47: Modell zur Beteiligung des Retinols an der Glycoprotein-Biosynthese.

Dieses Modell, geht davon aus, daß im ER ein membrangebundenes Enzym existiert, das spezifisch aus Ret-P und GDP-Man Ret-P-Man bilden kann. Fertiges Ret-P-Man liegt wahrscheinlich auf Grund der hohen Membranaktivität des Retinolteils in membranassoziierter Form vor. Es sollte dann, wie viele andere ER-Bestandteile auch, von Transportvesikeln zum Golgi-Apparat transportiert werden. Erst dort, dem Ort der Synthese von O-glycosidischen Zuckerketten und der "Processing"-Reaktionen der N-Glycoside befinden sich die geeigneten endogenen Substrate, die Mannose aus Ret-P-Man über eine Ret-P-Man:Protein-Mannosyltransferase akzeptieren können.

Ein Grund für die räumliche Trennung der beiden Teilaktivitäten könnte die Zugänglichkeit des Substrates GDP-Man sein. Im endoplasmatischen Retikulum müssen Aufnahmesysteme für GDP-Man existieren, da diese Verbindung sowohl für die Synthese von Dol-P-Man, als auch für den direkten Zuckertransfer über GDP-Man im Lumen des ER benötigt, jedoch nur im Cytoplasma synthetisiert wird (Coates et al., 1980). Die Ret-P-Man-Synthase könnte sich diese GDP-Man-Aufnahmesysteme im ER zunutze machen. Auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, daß GDP-Man nicht in Golgi-Vesikel aufgenommen werden kann (Carey & Hirschberg, 1981), Mannosylierungsreaktionen in dieser Organelle somit auf andere Substrate angewiesen sind. Aus Tabelle 12 ist ersichtlich, daß Dol-P-Man in in vitro-Experimenten diese Funktion nicht erfüllen kann, mit Ret-P-Man jedoch sehr gute Mannosylierungsraten erzielt werden.

Diese Vorstellung, daß das Lipidintermediat Ret-P-Man als Mannosendonator fungiert, steht nicht im Einklang mit der allgemein akzeptierten Ansicht, nach der O-Glycoside nur durch direkten Zuckertransfer aus den Nucleotidzuckern gebildet werden (2.1.3). Betrachtet man jedoch die experimentellen Daten, die zu dieser Ansicht führten, nämlich das Fehlen einer Tunicamycin-Inhibition sowie das Fehlen einer Stimulierung durch Zusatz von Dol-P (Hanover et al., 1980),

so lassen sich diese Experimente durchaus mit dem hier vorgestellten Modell vereinbaren, da beide experimentellen Ansätze auf eine Dol-P-Beteiligung abzielen und keinen Effekt auf die Ret-P-Man-vermittelte Mannosylierung zeigen sollten.

Über die physiologische Bedeutung des Mannosetransfers via Ret-P-Man kann zur Zeit nur spekuliert werden. Erst eine genauere Kenntnis der über Ret-P-Man gebildeten Oligosaccharid-Strukturen, sowie eine Charakterisierung der Natur der Proteinakzeptoren kann hier bessere Einblicke geben. In Anlehnung an schon bekannte Zuckererkennungssysteme, könnten die eingebauten Mannosereste jedoch als Signal für die Verteilung fertiger Glycoproteine in die verschiedenen Zellkompartimente wirken.

Spezifische Erkennungssysteme, die auf Wechselwirkungen mit Oligosaccharid-Ketten basieren, existieren für β -Galactose (Morell et al., 1968) und Fucose (Prieels et al., 1978) in Hepatocyten, sowie mit selber Spezifität für N-Acetylglucosamin und Mannose im Reticuloendothelial-System (Stahl et al., 1978). Das β -Galactose-System sorgt für den raschen Katabolismus löslicher Blutplasma-Glycoproteine. Diese haben in der Regel N-Acetylneuraminsäuren als endständige Zucker im Oligosaccharidteil. Gehen die terminalen Kohlenhydrate durch Angriff von Neuraminidasen verloren, werden die so entstandenen sogenannten Asialo-Glycoproteine, die jetzt endständige β -Galactose-Gruppen besitzen, sehr schnell von Leberrezeptoren gebunden und abgebaut. Für Ceruplasmin z.B. verringert sich die Halbwertszeit im Blut durch Abspaltung zweier N-Acetylneuraminsäuren von 54 hr auf 3-5 min.

Ein im Zusammenhang mit dieser Arbeit noch interessanteres Zuckererkennungssystem wurde von Neufeld et al. (1975) beschrieben. Diese Autoren stellten fest, daß Glycoproteine mit Mannose und Phosphatgruppen schnell und spezifisch von Fibroblasten endozytiert werden. Weitere Untersuchungen

zeigten, daß Mannose-6-Phosphat den spezifischen Marker für diesen Effekt darstellt. Die eigentliche Funktion des Man-6-P-Restes besteht jedoch nicht, wie ursprünglich angenommen, im Determinieren eines sekretorischen Weges, sondern in der Wirkung als Erkennungszeichen zum intrazellulären Transport vom Golgi-Apparat zu Lysosomen (Sly & Stahl, 1978).

Die Synthese von Man-6-P findet in zwei Schritten statt. Zuerst wird aus UDP-GlcNAc ein GlcNAc-1-P auf die Akzeptor-Mannose übertragen und im zweiten Schritt dann GlcNAc durch eine Phosphodiesterase abgespalten (Kornfeld et al., 1982). Beide Enzyme sind im SER und Golgi angereichert (Waheed et al., 1981; Varki & Kornfeld, 1981). Durch Bindung des so synthetisierten Man-6-P an hochaffine lysosomale Rezeptoren wird der spezifische Transport zu den Lysosomen bewerkstelligt.

Genetische Störungen dieses Erkennungssystems führen zu schweren Krankheiten, nämlich der I-Zellen-Krankheit (Leroy et al., 1971) und der sogenannten Pseudo-Hurler-Polydystrophy (Thomas et al., 1973). Für beide Krankheiten wurde als biochemische Ursache das Fehlen der N-Acetylglucosaminylphosphotransferase nachgewiesen (Reitman et al., 1981). Dadurch finden die neusynthetisierten lysosomalen Enzyme ihren eigentlichen Bestimmungsort nicht mehr und werden ins Blut sekregiert, wo sie eine Reihe von pathologischen Symptomen auslösen, die schon nach wenigen Lebensjahren zum Tod führen (Durand et al., 1982).

Die Mannosylierung über den Retinolweg könnte ein ähnliches Signal setzen, das zur Erkennung spezifischer Zielorte der mannosylierten Glycoproteine führt. Eine mögliche Funktion des Mannose-Markers könnte die Steuerung der Sekretion von Glycoproteinen sein. Einen, allerdings sehr indirekten, Hinweis liefert eine neue Arbeit von Kousvelari et al. (1983). Diese Autoren fanden in vitro bei Dol-P-Zusatz eine

3-5-fache Erhöhung der N-Glycosylierung von Proteinen. Neben dieser schon lange bekannten Tatsache, beobachteten sie jedoch keine signifikante Erhöhung der Sekretion von Glycoproteinen. Eine mögliche Interpretation dieser Befunde wäre das Fehlen eines notwendigen Signals zur Sekretion der reifen Glycoproteine, wie es die Mannosylierung über Ret-P-Man darstellen könnte.

Eine gestörte Sekretion von Proteinen könnte eine Vielzahl der physiologischen Ausfallerscheinungen bei Vitamin A-Defizit erklären. Man denke in diesem Zusammenhang nur an Hormone, die in der Regel glycosyliert sind, oder an Regulationsproteine, wie den "Epidermal Growth Factor", von dem gezeigt werden konnte, daß er Vitamin A-abhängig reguliert wird (Jetten, 1980). Der bei Vitamin A-Mangel durch Fehlen eines Mannosylierungssignals gestörte Export wichtiger Proteine könnte also die molekulare Grundlage der beobachteten physiologischen Wirkungen sein. Diese noch spekulative Arbeitshypothese eröffnet jedoch einen Weg für die molekulare Analyse von Retinoidwirkungen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adamo S., DeLuca L.M., Akalovsky I., Bhat P.V. (1979) Retinoid-induced adhesion in cultured transformed mouse-fibroblasts. *J.Natl.Canc.Inst.* 62, 1473-1478
- Akamatsu N., Hasegawa T. (1980) Lipidintermediates in glycoprotein synthesis during rat liver regeneration. *Int.J.Biochem.* 12, 489-492
- Allen C.M., Kalin J.R., Sack J., Verizzo D. (1978) CTP-dependent dolichol phosphorylation by mammalian cell homogenates. *Biochem.* 17, 5020-5026
- Anzano M.H., Lamb A.J., Olson J.A. (1979) Growth, appetite, sequence of pathological signs and survival following the induction of rapid, synchronous Vitamin A deficiency in the rat. *J.Nutr.* 109, 1419-1431
- Appelkvist E.L., Chojnacki T., Dallner G. (1981) Dolichol-(C55)mono- and pyrophosphates of the rat liver. *Bioscience Rep.* 1, 619-626
- Arion W.J., Ballas L.M., Lange A.J., Wallin B.K. (1976) Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose-6-phosphatase system. Interaction of the system with D-mannose-6-phosphate and D-mannose. *J.Biol.Chem.* 251, 4901-4907
- Aubert J.P., Biserte G., Loucheux-Lefebvre M.H. (1976) Carbohydrate peptide linkages in glycoproteins. *Archs.Biochem.Biophys.* 175, 410-418
- Babczinski P., Tanner W. (1973) Involvement of dolicholmonophosphate in the formation of specific mannosyl-linkages in yeast glycoproteins. *Biochem.Biophys.Res. Comm.* 54, 1119-1129
- Babczinski P., Haselbeck A., Tanner W. (1980) Yeast mannosyltransferases requiring dolichyl phosphate and dolichyl phosphate mannose as substrate. *Eur.J.Biochem.* 105, 509-515
- Bahl O.P. (1969) Human chorionic gonadotropin 2. Nature of Carbohydrate units. *J.Biol.Chem.* 244, 575-583
- Bartlett G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J.Biol.Chem.* 234, 466-468
- Bashor M.M., Chytil F. (1975) Cellular retinol-binding protein. *Biochim.Biophys.Acta* 411, 87-96

- Behrens N.H., LeLoir L.F. (1970) Dolicholmonophosphateglucose: An intermediate in glucosyltransfer in liver. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 66, 153-159
- Berger E.G., Buddecke E., Kamerling J.P., Kobata A., Paulson J. C., Vliegenhardt J.F.G. (1982) Structure, biosynthesis and functions of glycoproteins. *Experientia* 98, 1129-1162
- Beyer T.A., Rearick J.I., Paulson J.C., Prieels J.P., Sadler J.E., Hill R.L. (1979) Biosynthesis of mammalian glycoproteins. Glycosylation pathways in the synthesis of the non-reducing terminal sequences. *J.Biol.Chem.* 254, 12531-12541
- Beyer T.A., Sadler J.E., Rearick J.I., Paulson J.C., Hill R.L. (1981) Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharid structure and structure-function relationships. *Adv.Enzymol.* 52, 23-136
- Bhat P.V., Roller P.P., Deluca L.M. (1981) Chemical and biological studies on 5,6-epoxyretinol, retinol and their phosphorylesters. *J.Lipid Res.* 22, 1069-1078
- Bieri J.G., McDaniel E.G., Rogers W.E. (1969) Survival of germ free rats without Vitamin A. *Science* 163, 574-575
- Blaner W.S., Churchich J.E. (1980) The membrane bound retinol dehydrogenase from bovine rod outer segments. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 94, 820-826
- Bollag W., Matter A. (1981) From Vitamin A to retinoids in experimental and clinical oncology. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 359, 9-23
- Bolmer S.D., Wolf G. (1982) Retinoids and phorbol esters alter release of fibronectin from enucleated cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79, 6541-6545
- Bonnani F., DeLuca L.M., Levinson S.S., Wolf G. (1973) Glycoproteins from hamster respiratory tract and the response to Vitamin A. *Biochim.Biophys.Acta* 297, 441-451
- Brandan E., Fleischer B. (1982) Orientation and role of nucleosidediphosphatase and 5'-Nucleotidase in Golgi vesicles from rat liver. *Biochemistry* 21, 4640-4645
- Breitman T., Selonick S., Collins S. (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 2936-2940
- Burgos J., Hemming F.W., Pennock J.F., Morton R.A. (1963) Dolichol: A naturally occurring C₁₀₀-isoprenoid alcohol. *Biochem.J.* 88, 470-482

- Butschak G. (1976) Die Regulation der Zellteilungs- und Differenzierungsvorgänge in Tumorzellen. in: Butschak G. (Hrsg.) Biochemische Grundlagen der Teilung und Differenzierung von Normal- und Tumorzellen. G.Fischer, Jena. S. 251-321
- Caccam J.F., Jackson J.J., Eylar E.H. (1969) The biosynthesis of mannose-containing glycoproteins - a possible lipid intermediate. Biochem.Biophys.Res.Comm. 35, 505-511
- Carey D.J., Hirshberg C.B. (1981) Topography of sialiglycoproteins and sialyltransferases in mouse and rat liver Golgi. J.Biol.Chem. 256, 989-993
- Carson D.D., Lennarz W.J. (1978) Inhibition of polyisoprenoid and glycoprotein biosynthesis causes abnormal embryonic development. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 5709-5719
- Carson D.D., Earles B.J., Lennarz W.J. (1981) Enhancement of protein glycosylation in tissue slices by dolichylphosphate. J.Biol.Chem. 256, 11552-11557
- Chambers J., Forsee W.T., Elbein A.D. (1977) Enzymatic transfer of mannose from mannosyl-phosphoryl-polyprenol to lipid-linked oligosaccharides in pig aorta. J.Biol.Chem. 252, 2498-2506
- Chapman A., Fuijimoto K., Kornfeld S. (1980) The primary glycosylation defect in class E Thy 1-negative mutant mouse lymphoma cells is an inability to synthesize dolichol-P-mannose. J.Biol.Chem. 255, 4441-4446
- Christensen A.K. & Fawcett D.W. (1961) The fine structure of the interstitial tissue of opossum testis. J.Bio-phys.Biochem.Cytol. 9, 653-670
- Coates S.W., Garney T., Sommers L.W., Yeh M., Hirschberg C.B. (1980) Subcellular localization of sugar nucleotide synthetases. J.Biol.Chem. 255, 9225-9229
- Coolbear T., Mookerjee S., Hemming F.W. (1979) The effects of Triton X-100 on the transfer of mannose, glucose and N-acetylglucosamine phosphate to dolichol monophosphate by preparations of rough and smooth endoplasmic reticulum and of mitochondria of rat liver. Biochem.J. 184, 391-397
- Cope F.O., Knox K.L., Hall R.C., Rousseau J.E., Thustokowicz J.I. (1983) In vitro metabolism of retinol and retinoic acid in rat testes, interstitial cell nuclei, nuclear fractions and microsomes. Fed.Proc. 42, 394-394
- Creek K.E., Morre D.J., Silverman-Jones C.S., Shidoji Y., DeLuca L.M. (1983) Mannosyl carrier functions of retinylphos-

- phate and dolichylphosphate in rat liver endoplasmic reticulum. *Biochem.J.* 210, 541-547
- Dallner J. & Ernster C. (1968) Subfractionation and composition of microsomal membranes. *J.Histochem.Cytochem.* 16, 611-632
- Day J.F., Thornberg R.W., Thorpe R., Baynes J.W. (1980) Carbohydrate-mediated clearance of antibody-antigen complexes from circulation. The role of high mannose oligosaccharides in the hepatic uptake of IgM-antigen complexes. *J.Biol.Chem.* 255, 2360-2365
- DeLuca L.M., Rosso G., Wolf G. (1970) The biosynthesis of a mannlipid that contains a polare metabolite of 15-(¹⁴C)-retinol. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 41, 615-620
- DeLuca L.M., Maestri N., Rosso G., Wolf G. (1973) Retinol glycolipids. *J.Biol.Chem.* 248, 641-648
- DeLuca L.M., Silverman-Jones C.S., Barr R.M. (1975) Biosynthetic studies on mannlipids and mannoproteins of normal and Vitamin A-depleted hamster livers. *Biochim. Biophys.Acta* 409, 342-359
- DeLuca L.M., Silverman-Jones C.S., Frot-Coutaz J.P. (1976) Separation of mannosylretinylphosphate from dolichyl-mannosylphosphate by solvent extraction. *Anal.Biochem.* 75, 664-667
- DeLuca L.M., Frot-Coutaz J.P., Silverman-Jones C.S., Roller P. (1977) Chemical synthesis of phosphorylated retinoids (their mannosylacceptor activity in rat liver membranes). *J.Biol.Chem.* 252, 2575-2579
- Dingle J.T., Fell H.B., Goodman D.S. (1972) Effect of retinol and retinol binding protein on embryonic skeletal tissue in organ culture. *J.Cell Sci.* 11, 393-402
- Douer D., Koefler H.P. (1982) Retinoic acid. Inhibition of the clonal growth of human myeloid leukemia cells. *J.Clin.Invest.* 69, 277-283
- Dowling J.E., Wald G. (1960) The biological function of Vitamin A acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 46, 587-608
- Drummond J.C. (1920) The nomenclature of so called accessory food factors (Vitamins). *Biochem.J.* 14, 660-663
- Durand P., Pelizza A., Borrone C., Gatti R. (1982) I cell-disease and pseudo-Hurler polydystrophy. In: Durand P. & O'Brien J.S. (Hrsg.) "Genetic errors of glycoprotein metabolism" Springer, Berlin S. 191-211
- Euler v.B., Euler v.H., Hellström H. (1928) A-Vitamin-Wirkungen der Lipochrome. *Biochem.Z.* 203, 370

- Evans H.M., Bishop K.S. (1922) On an invariable and characteristic disturbance of reproductive function in animals reared on a diet poor in fat soluble Vitamin A. *Anat.Rec.* 23, 17
- Fawcett D.W. (1955) Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 15, 1475-1480
- Fawcett D.W. (1981) Smooth endoplasmic reticulum. In: Fawcett D.W. (Hrsg.) "The Cell" 2. Auflage, Saunders, Philadelphia. S. 330-352
- Fell H.B., Dingle J.T. (1967) Studies on the mode of action of excess Vitamin A. 6.Lysosomal protease and the degradation of cartilage matrix. *Biochem.J.* 87, 403-408
- Fleischer B. (1981) Orientation of glycoprotein galactosyltransferase and sialyltransferase enzymes in vesicles derived from rat liver Golgi apparatus. *J.Cell Biol.* 89, 246-255
- Fleischer S., Kervina M. (1974) Subcellular fractionation of rat liver. *Meth.Enz.* 31, 6-41
- Folch J., Lees M., Stanley S.G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226, 497-509
- Frolik C.A., Roberts A.B., Tavela T.E., Roller P.O., Newton D.L. (1979) Isolation and identification of 4-hydroxy and 4-oxo retinoic acid. In vitro metabolites of all-trans retinoic acid in hamster trachea and liver. *Biochem.* 18, 2092-2097
- Frolik C.A., Roller P.O., Roberts A.B., Sporn M.B. (1980) In vitro and in vivo metabolism of all-trans and 13-cis retinoic acid in hamsters. *J.Biol.Chem.* 255, 8057-8062
- Frot-Coutaz J.P. & DeLuca L.M. (1976) Chemical synthesis of all-trans- β -Retinoylphosphate. *Biocem.J.* 159, 799-801
- Frot-Coutaz J.P., Silverman-Jones C.S., DeLuca L.M. (1976) Isolation, characterization and biological activity of retinylphosphate from hamster intestinal epithelium. *J.Lipid Res.* 17, 220-230
- Fuchs E., Green H. (1981) Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by Vitamin A. *Cell* 25, 617-625
- Gallagher J.T., Corfield A.P. (1978) Mucin-type glycoproteins. *New Perspectives in Structure and Synthesis* 3, 38-55

- Ganguly J. (1969) Absorption of Vitamin A. *Am.J.Clin.Nutr.* 22, 923-933
- Gibson R., Schlesinger S., Kornfeld S. (1979) The nonglycosylated glycoprotein of VSV is temperature-sensitive and undergoes intracellular aggregation at elevated temperatures. *J.Biol.Chem.* 254, 3600-3607
- Glabe C.G., Hanover J.A., Lennarz W.J. (1980) Glycosylation of ovalbumin nascent chains. The spatial relationship between translation and glycosylation. *J.Biol.Chem.* 255, 9236-9242
- Goodall A.H., Fisher D., Lucy J.A. (1980) Cell fusion, haemolysis and mitochondrial swelling induced by retinol and derivatives. *Biochim.Biophys.Acta* 595, 9-14
- Goodman D.S., Huang H.S. (1965) Biosynthesis of Vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science* 149, 879-880
- Goodman D.S., Huang H.S., Shiratori T. (1966) Tissue distribution and metabolism of newly absorbed Vitamin A in the rat. *J.Lipid Res.* 6, 390-396
- Goodman D.S., Raz A. (1972) Extraction and recombinant studies of the interaction of retinol with human plasma retinol binding protein. *J.Lipid Res.* 13, 338-347
- Gottschalk A. (1972) Definition of glycoproteins and their delineation from other carbohydrate-protein complexes. in: Gottschalk A. (Ed.) *Glycoproteins Part A*. Elsevier, Amsterdam S. 24-31
- Grinna L.S., Robbins R.W. (1979) Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides. *J.Biol.Chem.* 254, 8814-8818
- Hagopian A., Eyler E.H. (1968) Glycoprotein biosynthesis: Studies on the receptor specificity of the polypeptidyl: N-Acetylgalactosaminyl transferase from bovine submaxillary gland. *Archs.Biochem.Biophys.* 128, 422-433
- Hanover J.A., Lennarz W.J. (1980) N-linked glycoprotein assembly. Evidence that oligosaccharide attachment occurs within the lumen of the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 255, 3600-3604
- Hanover J.A., Lennarz W.J., Young J.D. (1980) Synthesis of N- and O-linked glycopeptides in oviduct membrane preparations. *J.Biol.Chem.* 255, 6713-6716
- Hanover J.A., Elting J., Mintz G.R., Lennarz W.J. (1982) Temporal aspects of the N-glycosylation of human chorionic gonadotropin. *J.Biol.Chem.* 257, 172-177
- Hanover J.A., Lennarz W.J. (1982) Transmembrane assembly of

- N-linked glycoproteins. Studies on the topology of saccharide lipid synthesis. *J.Biol. Chem.* 257, 2787-2794
- Harpaz N., Schachter H. (1980) Control of glycoprotein synthesis. Processing of asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver Golgi α -D-mannosidases dependent on the prior action of UDP-N-acetylglucosamin: α -D-Mannosidase- β -2-N-Acetylglucosaminyl transferase. *J.Biol.Chem.* 255, 4894-4902
- Haselbeck A., Tanner W. (1982) Dolichylphosphate-mediated mannosyltransfer through liposomal membranes. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 79, 1520-1524
- Hasilik A., Neufeld E.F. (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues. *J.Biol.Chem.* 255, 4946-4950
- Hassel J.R., Silverman-Jones C.S., DeLuca L.M. (1978) The in vivo stimulation of mannose incorporation into mannosylretinylphosphate, dolichylmannosylphosphate and specific glycopeptides of rat liver by high doses of retinylpalmitate. *J.Biol.Chem.* 253, 1627-1631
- Hausser M., Sidell N., Kelly M., Donaldson C., Altman A., Mangelsdorf D. (1983) Specific high-affinity binding and biological action of retinoic acid in human neuroblastoma cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 5525-5529
- Hegemann P. (1984) Halorhodopsin, die lichtgetriebene Chloridpumpe in Halobakterium halobium. Untersuchungen zur Struktur und Funktion. Dissertation, Universität München.
- Helenius A., McCaslin D.R., Fries E., Tanford C. (1979) Properties of detergents. *Meth.Enz.* 56, 734-749
- Heller J. (1975) Interaction of plasma retinol-binding protein with its receptor. Specific binding of bovine and human retinol-binding protein to pigment epithelium cells from bovine eyes. *J.Biol.Chem.* 250, 3613-3619
- Helting T., Peterson P.A. (1972) Galactosyltransfer in mouse mastocytoma. Synthesis of a galactose containing polar metabolite of retinol. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 46, 429-436
- Hemberger J. (1980) Versuche zum retinolabhängigen Mannoseeinbau in höhere Zellen und Synthese daran beteiligter Substrate. Diplomarbeit, Universität Würzburg
- Hemming F. (1983) Biosynthesis of dolichols and related compounds. in: Porter J.W. (Ed.); Biosynthesis of isoprenoid compounds Vol 2, 307-354

- Hill H.D., Schwyzer M., Steinman H.M., Hill R.L. (1977) Ovine submaxillary mucin. Primary structure and peptide substrates of UDP-N-acetylgalactosamine:mucin-transferase. *J.Biol.Chem.* 252, 3799-3804
- Hof H., Wirsing C.H. (1979) Anti-infective properties of Vitamin A. *Z.Ernährungswiss.* 18, 221-232
- Holst A., Oesterheld D. (1983) Retinol does not affect cell growth in fibroblast cell cultures. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol.Chem.* 364, 563-573
- Holz G., Bergmeyer H.U. (1974) Bestimmung von Acetat mit Acetatskinase und Hydroxylamin. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) *Methoden der*
- Huang H.S., Goodman D.S. (1965) Intestinal absorption and metabolism of ^{14}C -labelled Vitamin A alcohol and β -carotene in rat. *J.Biol.Chem.* 240, 2839-2844
- Hubbard S.C., Robbins P.W. (1980) Synthesis of N-linked oligosaccharides of glycoproteins. Assembly of the lipid-linked precursor oligosaccharides and its relation to protein synthesis in vivo. *J.Biol.Chem.* 255, 11782-11793
- Isler O., Huber W., Ronco A., Kofler M. (1947) Synthese des Vitamin A. *Helv.Chim.Acta* 30, 1911-1927
- Jetten A.M., Jetten M.E.R., Shapiro S.S., Poon J.P. (1979) Characterization of the action of retinoids on mouse fibroblast cell lines. *Exp.Cell Res.* 119, 289-299
- Jetten A.M. (1980) Retinoids specifically enhance the number of epidermal growth factor. *Nature* 284, 626-629
- Johansen P.G., Marshall E.D., Neuberger A. (1961) Carbohydrates in proteins. 3. The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen's egg albumin. *Biochem.J.* 78, 518-527
- Kanai M., Raz A., Goodman D.S. (1968) Retinol binding protein: The transport protein for Vitamin A in human plasma. *J.Clin.Invest.* 47, 2025
- Kanda Y., Goodman D.S., Canfield R.E., Morgan F.J. (1974) The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J.Biol.Chem.* 249, 6796-6805
- Kaplan A., Achord D.T., Sly W.S. (1977) Phosphohexyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors of human fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 2026-2030
- Karrer P., Helfenstein A., Wehrli H., Wettstein A. (1930) *Pflanzenfarbstoffe XXV. Über die Konstitution des*

- Lycopins und Carotins. *Helv.Chim.Acta* 13, 1084-1099
- Karrer P., Morf R., Schöpp K. (1931) Zur Kenntnis des Vitamin A aus Fischtranen. *Helv.Chim.Acta* 14, 1036-1040
- Keller R.K., Tamkun J.W., Adair W.L. (1981) Development of a quantitative assay for tissue levels of dolichylphosphate. *Biochemistry* 20, 5831-5836
- Kim Y.L., Wolf G. (1975) Vitamin A deficiency and glycoproteins of rat corneal epithelium. *J.Nutr.* 104, 710-718
- Kölling E., Gärtner W., Oesterheld D., Ernst L. (1984) Sterisch fixiertes Retinal-Analogon verhindert Protonen-pumpaktivität im Bacteriorhodopsin. *Angew.Chem.* 96, 76-78
- Kornfeld R., Kornfeld S. (1976) Comparative aspects in glycoprotein structure. *Ann.Rev.Biochem.* 45, 217-237
- Kornfeld S., Reitman M.L., Varki A., Goldberg D., Gabel C.A. (1982) Steps in the phosphorylation of the high mannose oligosaccharides of lysosomal enzymes. In: Ciba Foundation Symposia 92 "Membrane recycling" S. 138-156
- Kousvelari E.E., Grant S.R., Baum B.J. (1983) Dolichyl phosphate supplementation increases N-linked protein glycosylation in rat parotid arinar cells without increasing glycoprotein secretion. *Exp.Cell Res.* 149, 271-276
- Lämmli U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Leroy J.G., Spranger J.W., Feingold M., Opitz J.M., Crocker A.C. (1971) I-cell disease: a clinical picture. *J.Pediat.* 79, 360-365
- Levy J.R., Carminatti H., Cantarella A.I., Behrens N.H., LeLoir L.F., Tabora E. (1974) Mannose transfer to lipid-linked di-N-acetylchitobiose. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 60, 118-125
- Liau G., Ong D.E., Chytil F. (1981) Interaction of the retinol/cellular retinol binding protein complex with isolated nuclei and nuclear components. *J.Cell Biol.* 91, 63-68
- Lotan R. (1980) Effects of Vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim.Biophys. Acta* 605, 33-91
- Lotan R., Ong D.E., Chytil F. (1980) Comparison of the level of cellular retinoid-binding proteins and susceptibility to retinoid-induced growth inhibition of various

neoplastic cell lines. *J.Natl.Canc.Inst.* 64, 1259-1262

Lotan R., Lotan D., Kadowi A. (1982) Comparison of retinoic effects on anchorage dependent growth, anchorage independent growth and fibrinolytic activity of neoplastic cells. *Exp.Cell Res.* 141, 79-86

Lotan R., Neumann G., Deutsch V. (1983) Identification and characterization of specific changes induced by retinoic acid in cell surface glycoconjugates of S 91 murine melanoma cells. *Canc.Res.* 43, 303-312

Martin H.G., Thorne K.J.I. (1974) The involvement of endogenous dolichol in the formation of lipid-linked precursors of glycoprotein in rat liver. *Biochem.J.* 138, 281-289

Masushige S., Schreiber J.B., Wolf G. (1978) Identification and characterization of mannosylretinylphosphate occurring in rat liver and intestine in vivo. *J.Lipid Res.* 19, 619-627

McCloskey M.A., Troy F.A. (1980) Paramagnetic isoprenoid carrier lipids. 2. Dispersions and dynamics in lipid membranes. *Biochem.* 19, 2061-2066

McCollum E.V., Kennedy C. (1916) The dietary factors operating in the production of polyneuritis. *J.Biol.Chem.* 24, 491-502

McCormick A.M., Napoli J.C., Yoshizawa S., DeLuca H.F. (1980) 5,6-Epoxyretinoic acid as a physiological metabolite of retinoic acid in the rat. *Biochem.J.* 186, 475-481

Meyer F.A., King M., Gelman R.A. (1975) On the role of sialic acid in the rheological properties of mucus. *Biochim. Biophys.Acta* 392, 223-232

Mizhari B., O'Malley J.A., Corter W.A., Takatsuki A., Tamura G., Sulkowski E. (1978) Glycosylation of interferons. Effects of tunicamycin on human immune interferon. *J.Biol.Chem.* 253, 7612-7615

Molnar J., Chao H., Ikehara Y. (1971) Phosphoryl-N-acetylglucosamin transfer to a lipid acceptor of liver microsomal preparations. *Biochim.Biophys.Acta* 239, 401-410

Moore L.A., Hoffmann C.F., Duncan C.W. (1935) Blindness in cattle associated with a constriction of the optic nerve and probably of nutritional origin. *J.Nutr.* 9, 533

Morell A.J., Irvine R.A., Sternlieb I., Scheinberg I.H. (1968) Physical and chemical studies on ceruloplasmin. 5. Metabolite studies on sialic acid free ceruloplasmin in vivo. *J.Biol.Chem.* 243, 155-159

- Nakajima T., Ballou C.E. (1974) Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation. *J.Biol.Chem.* 249, 7679-7684
- Nakamura S., Hayashi S., Koga K. (1976) Effect of perjodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidase. *Biochim.Biophys.Acta* 445, 294-308
- Nadowicz M.R., Chi M.M.Y., Lowry O.H., Sly W.S. (1979) Enzymatic identification of mannose-6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of β -glucuronidase by human fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76, 4322-4326
- Neufeld E.F., Lim T.W., Shapiro L.J. (1975) Inherited disorders of lysosomal metabolism. *Ann.Rev.Biochem.* 44, 357-376
- Neufeld E.F., Ashwell G. (1980) Carbohydrate recognition systems for receptor-mediated pinocytosis. In: Lennarz W.J.(Ed.); *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*. Plenum, New York S. 241-267
- Neuhoff V., Philipp K., Zimmer H.G., Mesecke S. (1979) A simple versatile, sensitive and volumen-independent method for quantitative protein determination, which is independent of other external influences. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 360, 1657-1670
- Nyquist S.E., Crane F.L., Morre D.J. (1971) Vitamin A concentration in rat liver Golgi apparatus. *Science* 173, 939-941
- Oates M.D.G., Rosbottom A.C., Schragger J. (1974) Further investigations into the structure of human gastric mucin. The structural configuration of the oligosaccharide chains. *Carbohydrate Res.* 34, 115-137
- Oesterheldt D. (1976) Bakteriorhodopsin als Beispiel einer lichtgetriebenen Protonenpumpe. *Angew.Chem.* 88, 16-24
- Olden K., Pratt P.M., Jaworski C., Yamada K.M. (1979) Evidence for the role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport. Specific inhibition by tunicamycin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76, 791-795
- Olson J.A., Hayashi O. (1965) Enzymatic cleavage of β -carotene into Vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 54, 1364-1370
- Olson J.A. (1983) Formation and function of Vitamin A. In: Porter J.W. & Spurgeon S.C. (Hrqb.) *"Biosynthesis of isoprenoid compounds"* 2; Wiley, New York S. 371-413
- Omori M., Chytil F. (1982) Mechanism of Vitamin A action.

Gene expression in retinol deficient rats. *J.Biol.Chem.* 257, 14370-14374

O'Malley B.W., Means A.R. (1974) Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science* 183, 610-620

Ong D.E., Chytil F. (1976) Changes in levels of cellular retinol and retinoic acid binding proteins of liver and lung during perinatal development of rat. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 73, 3976-3978

Palade G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358

Palay S.L. (1958) The morphology of secretion. In: Palay S. L. (Hrqb.) "Frontiers in cytology", Yale University press, New Haven S. 305-342

Pawson B.A. (1981) A historical introduction to the chemistry of Vitamin A and its analogs (retinoids). *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 359, 1-8

Peterson P.A., Rask L., Helting T., Östberg L., Fernstedt Y. (1976) Formation and properties of retinylphosphate galactose. *J.Biol.Chem.* 251, 4986-4995

Pless D.D., Lennarz W.J. (1977) Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 134-138

Popjak G., Edmond J., Clifford K., Williams V. (1969) Biosynthesis and structure of a new intermediate between farnesyl phosphate and squalene. *J.Biol.Chem.* 244, 1897-1918

Prehm P. (1980) Induction of hyaluronic acid synthesis in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *FEBS Letters* 111, 295-298

Prieels J.P., Pizzo S.V., Glasgow L.R., Paulson J.C., Hill R.L. (1978) Hepatic receptor that specifically bind oligosaccharides containing fucosyl- α -1 $\rightarrow$ 3 β N-acetylglucosamine linkages. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75, 2215-2219

Quill H. & Wolf G. (1981) Formation of α -1,2- and α -1,3-linked mannose disaccharides from mannosyl retinyl phosphate by rat liver membrane enzymes. *Ann.N.Y.Acad.-Sci.* 359, 331-344

Rask L., Peterson P.A. (1976) In vitro uptake of Vitamin A from retinol-binding protein to mucosal epithelial cells from monkeys small intestine. *J.Biol.Chem.* 251, 6360-6366

Rask L., Anundi H., Böhme J., Eriksson U., Ronne H., Sege K., Peterson P.A. (1981) Structural and functional studies

- of Vitamin A - binding proteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 359, 79-90
- Razzell W.E. (1963) Phosphodiesterases. *Meth.Enz.* 6, 236-258
- Rearick J.I., Fuijimoto K., Kornfeld S. (1981) Identification of the mannosyl donors involved in the synthesis of lipid-linked oligosaccharides. *J.Biol.Chem.* 256, 3762-3769
- Reitman M.L., Varki A., Kornfeld S. (1981) Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydys-trophy are deficient in UDP-N-acetylglucosamine:glyco-protein-N-acetylglucosaminylphosphotransferase activi-ty. *J.Clin.Invest.* 67, 1574-1579
- Richards J.B., Hemming F.W. (1972) Dolichols, ubichinones, geranylgeraniol and farnesol as the major metabolites of mevalonate in *Phytophthora cactorum*. *Biochem.J.* 128, 1345-1352
- Rip J.W., Rupar C.A., Chaudhary N., Carroll K.K. (1981) Loca-lization of a dolichylphosphate phosphatase in plasma membranes of rat liver. *J.Biol.Chem.* 256, 1929-1934
- Rosso G., DeLuca L.M., Warren C.D., Wolf G. (1975) Enzymatic synthesis of mannosylretinylphosphate from retinylphos-phate and guanosinediphosphate mannose. *J.Lipid Res.* 16, 235-243
- Rosso G.C., Masushige S., Warren C.D., Kiorpes T.C., Wolf G. (1976) Anomeric configuration of D-mannosyl retinyl phosphate from retinyl phosphate and guanosine diphos-pho mannose. *J.Biol.Chem.* 251, 6465-6567
- Rosso G., Masushige S., Quill H., Wolf G. (1977) Transfer of mannose from mannosylretinylphosphate to protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 3762-3766
- Rosso G., Bendrick C.J., Wolf G. (1981) In vivo synthesis of lipid-linked oligosaccharides in the livers of normal and Vitamin A deficient rats. *J.Biol.Chem.* 256, 8341-8347
- Rothman J.E., Fine R.E. (1980) Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 780-784
- Ruddon R.W., Bryan A.H., Hanson C.A., Perini F., Ceccorulli L.M., Peters B.P. (1981) Characterization of the intracel-lular and secreted forms of the glycoprotein hormone chorionic gonadotropin produced by human malignant cells. *J.Biol.Chem.* 256, 5189-5196

- Sani B.P., Donovan K. (1979) Localization of retinoic acid binding protein in nuclei and the nuclear uptake of retinoic acid. *Cancer Res.* 39, 2492-2496
- Sasak W., Silverman-Jones C.S., DeLuca L.M. (1979) Separation of mannosylretinylphosphate from dolichylmannosylphosphate by chromatography on columns of DEAE-Sephacel. *Anal.Biochem.* 97, 298-301
- Sasak W., DeLuca L.M. (1980) Mannosyltransfer from mannosylretinylphosphate to glycoconjugates of rat liver membranes. *FEBS Letters* 114, 313-318
- Sasak W., DeLuca L.M., Dion D.L., Silverman-Jones C.S. (1980) Effect of retinoic acid on the cell surface glycoprotein of cultured spontaneously transformed mouse fibroblasts (Balb/c 3T12 cells). *Canc.Res.* 40, 1344-1349
- Sato M., DeLuca L.M., Muto Y. (1978) Effects of exogenous retinol and retinoic acid on the biosynthesis of ¹⁴C-mannose labelled glycolipids and glycoproteins in rat liver. *J.Nutr.Sci.Vitam.* 24, 9-23
- Schachter H., McGuire E.J., Roseman S. (1971) Sialic acids XIII. A uridine diphosphate-D-galactose:mucin galactosyltransferase from porcine submaxillary gland. *J.Biol.Chem.* 246, 5321-5328
- Schachter H., Roseman S. (1980) Mammalian glycosyltransferases: Their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and glycolipids. In: Lennarz W.J.(Ed.) *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*. Plenum, New York S. 85-161
- Schobert B., Lanyi J.K. (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J.Biol.Chem.* 257, 10306-10313
- Schroder E.W., Rapaport E., Kabeenell A.K., Bluck P.H. (1982) Growth inhibitory and stimulatory effects of retinoic acid for murine 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79, 1549-1552
- Schwaiger H., Hasilik A., von Figura H., Wiemken A., Tanner W. (1982) Carbohydrate free carboxypeptidase Y is transferred into lysosome-like yeast vacuole. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 104, 950-956
- Shantz E.M., Cowley J.D., Embree N.D. (1943) Anhydro-("cyclicized")-Vitamin A. *J.Amer.Chem.Soc.* 65, 901-906
- Sharma C.B., Babczinski P., Lehle L., Tanner W. (1974) The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein synthesis of *S.cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* 46, 35-41
- Shidoji Y. & DeLuca L.M. (1981) Rat liver microsomes catalyze the mannosyltransfer from GDP-D-Mannose to

- retinylphosphate with high efficiency in the absence of detergents. *Biochem.J.* 200, 529-538
- Shidoji Y., Sasak W., Silverman-Jones C.S., DeLuca L.M. (1981) Recent studies on the involvement of retinylphosphate as a carrier of mannose in biological membranes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 359, 345-357
- Shidoji Y., Silverman-Jones C.S., DeLuca L.M. (1982) The polyenic system of retinylphosphate is required for its mannosyl donor activity but not for acceptor activity. *Biochem.J.* 208, 865-868
- Sly W.S., Stahl P. (1978) Receptor mediated uptake of lysosomal enzymes. *Life Sci.Res.Rep.* 11, 229-244
- Smith J.E., Milch P.O., Muto Y., Goodman D.S. (1973) The plasma transport and metabolism of retinoic acid in the rat. *Biochem.J.* 132, 821-827
- Smith M.J., Schreiber J.B., Wolf G. (1979) Subcellular localization of the enzyme that forms mannosyl retinyl phosphate from guanosine diphosphate (^{14}C)mannose and retinyl phosphate. *Biochem.J.* 180, 449-453
- Snider M.D., Sultzman L.A., Robbins P.W. (1980) Transmembrane localization of oligosaccharide-lipid synthesis in microsomal vesicles. *Cell* 21, 385-392
- Snider M.D., Robbins P.W. (1982) Transmembrane organization of protein glycosylation. Mature oligosaccharide-lipid is located on the luminal side of microsomes from chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* 257, 6796-6801
- Spiro R.G. (1972) Study of carbohydrates of glycoproteins. *Meth.Enz.* 28, 3-42
- Spiro M.J., Spiro R.G. (1976) Lipid-saccharide intermediates in glycoprotein synthesis II. Studies on the structure of an oligosaccharide-lipid from thyroid. *J.Biol.Chem.* 251, 6409-6419
- Spiro M.J., Spiro R.G., Bhoyroo V.D. (1979) Glycosylation of proteins by oligosaccharide lipids. *J.Biol.Chem.* 254, 7668-7674
- Sporn M.B., Dunlop N.M., Newton D.L., Smith J.M. (1976) Prevention of chemical carcinogenesis by Vitamin A and its synthetic analogs. *Fed.Proc.* 35, 1332-1338
- Sporn M.B., Newton D.L. (1979) Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed.Proc.* 38, 2529-2534
- Springer T.A., Mean D.L., DeFranco A.L., Strominger J.L. (1977) Detergent solubilization, purification and separation

of specificities of HLA antigens from cultured human lymphoblastoid line RPMI 4265. *J.Biol.Chem* 252, 4682-4693

- Stahl P.D., Rodman J.S., Miller M.J., Schlesinger P.H. (1978) Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75, 1399-1403
- Strickland S., Mahdavi V. (1978) Induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* 15, 393-403
- Strous J.J.A.M. (1979) Initial glycosylation of proteins with acetylgalactosaminylserine linkages. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76, 2694-2698
- Struck K.D., Lennarz W.J. (1980) The function of saccharide-lipids in synthesis of glycoproteins. In: Lennarz W.J.(Ed.) *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*. Plenum, New York S.35-85
- Stubbs J.W., Saari J.C., Futterman S. (1979) 11-cis-Retinal-binding protein from bovine retina. *J.Biol.Chem.* 254, 8529-8533
- Tabas I., Kornfeld S. (1979) Purification of a rat liver Golgi α -mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides. *J.Biol.Chem.* 254, 11655-11663
- Tai T., Yamashita K., Ito S., Kobata A. (1977) Structures of the carbohydrate moiety of ovalbumin glycopeptide III and the difference in specificity of endo- β -N-acetylglucosaminidases C_{II} and H. *J.Biol.Chem.* 252, 6687-6694
- Takase S., Ong D.E., Chytil F. (1979) Cellular retinol-binding protein allows specific interaction of retinol with the nucleus in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76, 2204-2208
- Tanaka K., Bertolini M., Pigman W. (1964) Serine and threonine glycosidic linkages in bovine submaxillary gland. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 16, 404-409
- Tanford C., Reynolds J.A. (1976) Characterization of membrane proteins in detergent solution. *Biochim.Biophys. Acta* 457, 133-170
- Tanner W., Haselbeck A., Schwaiger H., Lehle L. (1982) Synthesis and possible role of carbohydrate moieties of yeast glycoproteins. *Phil.Trans.R.Soc.London* B300, 185-194
- Thomas J.H., Taylor H.A., Reynolds L.W., Miller C.S. (1973) Mucopolidiosis III (pseudo-Hurler polydystrophy). Multiple lysosomal enzyme abnormalities in serum and cultured fibroblast cells. *Pediatr.Res.* 7, 751-756

- Thompson J.N., Howell J.M., Pitt J.A.J. (1964) Vitamin A and reproduction in rat. *Proc.Roy.Soc.London* 159, 510-535
- Tkacz J., Lampen J.O. (1975) Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf liver microsomes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 65, 248-257
- Tsukida K., Saiki K. (1982) Phosphorylated polyenols of biochemical interest: cis/trans stereoisomeric retinyl phosphates *J.Nutr.Sci.Vitam.* 28, 93-103
- Tulsiani D.R.P., Hubbard S.C., Robbins P.W., Touster O. (1982) α -Mannosidases of rat liver Golgi membranes. Mannosidase II is the GlcNAc₂Man₅-cleaving enzyme in glycoprotein biosynthesis and mannosidases IA and IB are the enzymes converting Man₉-precursors to Man₅-intermediates. *J.Biol.Chem.* 257, 3660-3668
- Vaheri A., Alitalo K., Hedman K., Keski-Oja J., Kurkinen M., Wartiovaara J. (1978) Fibronectin and the pericellular matrix of normal and transformed adherent cell. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 312, 343-353
- Vliegenhardt J.F.G., Dorland L., v.Halbeck H. (1983) High resolution ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. *Adv.Carbohyd.Res.* 41, 209-375
- Waheed A., Pohlmann R., Hasilik A., von Figura K. (1981) Subcellular location of two enzymes involved in the synthesis of phosphorylated recognition markers in lysosomal enzymes. *J.Biol.Chem.* 256, 4150-4152
- Wald G. (1960) The visual function of Vitamin A. *Vit.Horm.* 18, 417-430
- Wald G. (1968) The molecular basis of visual excitation *Nature* 219, 800-807
- Walter K., Schütt C. (1974) Saure und alkalische Phosphatase im Serum. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) *Methoden der enzymatischen Analyse* 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1, 888-892
- Watkins W.M., Morgan W.T.J. (1952) Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature* 169, 825-826
- Wolbach S.B., Howe P.R. (1925) Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. *J.Exp.Med.* 42, 753
- Yuspa S.H., Harris C.C. (1974) Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinylacetate in vitro. *Exp.Cell Res.* 86, 95-105

- Zile M.H., DeLuca H.F. (1968). Retinoic acid: Some aspects of growth promoting activity in the albino rat. J.Nutr. 94, 302
- Zile M.H., Inhorn R.C., DeLuca H.F. (1982) Metabolites of all-trans retinoic acid in bile. Identification of all-trans and 13-cis retinoyl glucuronides. J.Biol. Chem. 257, 3537-3543
- Zile M.H., Cullum M.E. (1983) The function of Vitamin A. Current concepts. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 172, 139-152

7. ABKÜRZUNGEN

BSA	Rinderserumalbumin
BTAP	Bis-triethyl-ammoniumphosphat
C/M	Chloroform/Methanol
C/M/H	Chloroform/Methanol/Wasser
cpm	counts pro Minute
CRABP	Zelluläres Retinal-bindendes Protein
CRBP	Zelluläres Retinol-bindendes Protein
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE-	Diethyl-aminoethan-
Dol-P	Dolichylphosphat
Dol-P-Man	Dolichyl-phospho-mannose
dpm	Zerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Na ₂ -Salz
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GDP-Man	Guanosindiphospho-Mannose
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
HLB	Hydrophil-lipophile Balance
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
K-PO ₄	Kaliumphosphat-Puffer
Man	Mannose
MES	N-Morpholino-ethansulfonsäure
MF	Mikrosomale Membranfraktion
P _i	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykoll
PIC	Ionenpaar-Chromatographie

RBP	Retinol-bindendes Protein
RER	Rauhes endoplasmatisches Retikulum
Ret-P	Retinylphosphat
Ret-P-Man	Retinyl-phospho-mannose
RP-	Umkehrphasen-
rpm	Umdrehungen pro minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SER	Glattes endoplasmatisches Retikulum
Sial	N-Acetylneuraminsäure
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
üs	Überstand

LEBENS LAUF

Name: Jürgen Rudolf Hemberger

Geburtsdatum: 16.1.54

Geburtsort: Aschaffenburg

Eltern: Karl Hemberger, Betriebswirt
Margareta Hemberger geb. Heller, Hausfrau

1960 - 1964 Volksschule Aschaffenburg-Strietwald

1964 - 1971 Friedrich-Dessauer-Gymnasium, mat.nat.wiss.
Zweig, Aschaffenburg

1971 - 1973 Karl-Rehbein-Schule, mat.nat.wiss. Zweig,
Hanau

1973 Abitur

1973 - 1974 Studium der Chemie an der Justus-Liebig-
Universität, Mainz

1974 - 1978 Fortsetzung des Chemie-Studiums an der
Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

1978 Diplom-Prüfung

1979 - 1980 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. D.
Oesterheldt am Institut für Biochemie der
Universität, Würzburg

1980 - 1983 Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof.
D. Oesterheldt am Max-Planck-Institut für
Biochemie, Martinsried

